

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Departamento de Patología Animal I (Sanidad animal)**



**TESIS DOCTORAL**

**Investigación y problemática de la presencia de aflatoxinas  
en leche y productos lácteos fermentados (yogur, queso)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**José Luis Blanco Cancelo**

DIRECTOR:

**Guillermo Suárez Fernández**

**Madrid, 2015**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Veterinaria

Departamento de Patología Animal I

TP  
1988  
029



X-53-107272-9

**INVESTIGACION Y PROBLEMATICA DE LA  
PRESENCIA DE AFLATOXINAS EN LECHE Y  
PRODUCTOS LACTEOS FERMENTADOS  
(YOGUR, QUESO)**



José Luis Blanco Cancelo

Madrid, 1988

Colección Tesis Doctorales. N.º 29/88

© José Luis Blanco Cancelo

Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 3 - 28015 Madrid  
Madrid, 1988  
Ricoh 3700  
Depósito Legal: M-2147-1988

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

" INVESTIGACION Y PROBLEMÁTICA DE LA PRESENCIA DE AFLATOXINAS  
EN LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS FERMENTADOS (YOGUR, QUESO) "

JOSE LUIS BLANCO CANELO

Memoria presentada para  
optar al grado de Doctor  
en Veterinaria

Madrid, 1986







UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DON GUILLERMO SUAREZ FERNANDEZ, CATEDRATICO DE MICROBIOLOGIA DE  
LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que lleva por título "Investigación y Problemática de la presencia de aflatoxinas en leche y productos lácteos fermentados (queso y yogur)", de la que es autor el Licenciado en Veterinaria D. JOSE LUIS BLANCO CANELO, se ha realizado en los laboratorios del Departamento de Microbiología de esta Facultad bajo nuestra dirección, destacando su elevada densidad experimental y la contribución positiva del planteamiento propuesto, tal y como se refleja en las conclusiones alcanzadas.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Madrid a tres de Septiembre de mil novecientos ochenta y seis.



*A mis padres*

*A Maria Silvia*

*Para ti*



### AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento más sincero a cuantos a lo largo de la realización del presente trabajo de Tesis Doctoral me han ayudado, animado, aconsejado o simplemente soportado. Todos ellos han contribuido en alguna forma a hacer realidad esta Memoria.

De entre todos ellos quiero destacar a las siguientes personas:

Al Dr. Lucas Domínguez por el mucho tiempo dedicado al presente Trabajo, durante la fase experimental primero y en la fase de redacción después. Su ayuda material, ideas y consejos han sido decisivos para llevar a término las investigaciones propuestas.

Al Dr. Guillermo Sudrez por haberme introducido en el maravilloso mundo de la Microbiología y haber confiado en mí para la realización de este trabajo.

Al Dr. Elías F. Rodríguez Ferri por sus atinados consejos que siempre me han sido de utilidad.

A la Dra. Esperanza Gómez-Lucía por tantas cosas que sobrepasan ampliamente el concepto de compañerismo y que sólo pueden ser entendidas dentro del término amistad.

A Central Quesera S.A., y en especial a sus técnicos J. Lizarralde y J. Rosique por su inestimable colaboración en los estudios realizados sobre el queso Madurado.

A Central Lechera LENOSA, y en especial a su técnico Sr. Garrido por la colaboración prestada en la toma de muestras de leche comercial.

A los Dres. Santiago Vadillo y Ricardo de la Fuente por la ayuda prestada en el inicio de mis investigaciones.

Al Dr. José F. Fernández Garayzábal por su ánimo siempre dispuesto a echar una mano donde hiciera falta.

*A D. Joaquín Goyache por su ayuda durante la fase de redacción de esta Tesis y muy especialmente en la elaboración de las distintas tabla y figuras.*

*A D. José A. García Cabrera y Dña Teresa Requena por su ayuda en el trabajo de laboratorio.*

*A todos los miembros del Departamento de Microbiología de la Facultad de Veterinaria de Madrid por hacer que me sienta plenamente integrado en el mismo: Dr. Manuel González, Dra Maria Jesús Payá, Dra Ana Mateos, Dra Maite Cutuli, Dr. Miguel Angel Moreno, Dña Mari Carmen Ramos, D. Jose Antonio Vázquez, Dña Paula Echalecu, D. Félix Fernández y Dña Pilar Capón, así como a los miembros del Departamento de Microbiología de la Facultad de Veterinaria de Cáceres, D. Jorge Valle y D. Claudio Ambrosio.*

*Los caminos de fantasía sólo puedes encontrarlos en tus deseos. Y sólo puedes ir de un deseo a otro. Lo que no deseas te resulta inalcanzable. Y tampoco basta con querer marcharse de un lugar. Tienes que querer ir a otro. Tienes que dejarte llevar por tus deseos.*

*Michael Ende*

*" La historia interminable "*





INDICE

I. INTRODUCCION .....	1
I.1. CONTAMINACION INDIRECTA DE LA LECHE Y PRODUCTOS LACTEOS POR AFLATOXINAS .....	5
I.1.a. Transformación de aflatoxina B <sub>1</sub> en M <sub>1</sub> .....	6
I.1.b. Presencia de aflatoxina M <sub>1</sub> en leche y productos lácteos .....	12
I.1.c. Contaminación indirecta del queso por aflatoxinas .	20
I.1.c.1. Influencia del procesado del queso sobre la aflatoxina M <sub>1</sub> presente en la leche de partida.	20
I.1.c.2. Unión M <sub>1</sub> - caseína .....	24
I.1.c.3. Influencia del madurado y almacenamiento del queso sobre las aflatoxinas .....	27
I.1.d. Influencia del procesado de la leche sobre su contenido en aflatoxinas .....	29
I.1.d.1. Efecto del almacenamiento en refrigeración ...	30
I.1.d.2. Efecto de la congelación .....	32
I.1.d.3. Efecto del tratamiento térmico .....	32
I.1.d.4. Efecto del desnatado .....	35
I.1.d.5. Efecto del proceso de elaboración de la mantequilla .....	36
I.1.d.6. Efecto del procesado del queso fundido .....	36
I.1.d.7. Efecto de la elaboración de leche concentrada.	37
I.1.d.8. Efecto de la elaboración de yogur .....	37
I.1.d.9. Efecto de la elaboración de productos lácteos congelados .....	39
I.2. CONTAMINACION DIRECTA DE LOS PRODUCTOS LACTEOS POR AFLATOXINAS .....	40
I.2.a. Aislamiento de hongos aflatoxicogénicos de productos lácteos .....	40
I.2.a.1. Queso .....	40
I.2.a.2. Yogur .....	44
I.2.a.3. Otros productos lácteos .....	45

- II -

1.2.b. Estudio de la producción de aflatoxinas en productos lácteos .....	46
1.2.b.1. Queso .....	46
1.2.b.2. Yogur .....	55
1.2.b.3. Otros productos lácteos .....	56
1.2.c. Factores que influyen en la producción de aflatoxinas en productos lácteos .....	59
1.2.c.1. Temperatura .....	59
1.2.c.2. Humedad (actividad de agua) .....	62
1.2.c.3. pH .....	62
1.2.c.4. Factore nutritivos del medio .....	65
1.2.c.5. Atmósfera .....	66
1.2.c.6. Luz .....	67
1.2.c.7. Cloruro sódico .....	68
1.2.c.8. Sustancias antifúngicas .....	69
1.2.c.9. Fenómenos de competencia microbiana .....	70
1.2.d. Determinación de aflatoxinas B y G en muestras comerciales de productos lácteos .....	74
1.3. TECNICAS DE DETERMINACION DE AFLATOXINAS EN LECHE Y PRODUCTOS LACTEOS .....	79
1.3.a. Análisis biológico .....	80
1.3.b. Análisis Fisico-químico .....	82
1.3.b.1. Cromatografía en capa fina .....	83
1.3.b.2. Cromatografía líquida de alta eficacia .....	85
1.3.c. Inmunoanálisis .....	86
1.3.d. Métodos de confirmación de aflatoxinas .....	90
1.4. TOXICIDAD DE LAS AFLATOXINAS .....	92
1.5. TOXICIDAD DE LAS AFLATOXINAS EN EL HOMBRE .....	98
1.5.a. Toxicidad aguda .....	99
1.5.b. Toxicidad crónica y carcinogenicidad .....	104

I.6. LEGISLACION SOBRE AFLATOXINAS .....	116
I.7. PROBLEMÁTICA DE LAS AFLATOXINAS EN ESPAÑA .....	121
I.8. OBJETIVOS E INTERÉS DEL TRABAJO .....	128
II. MATERIAL Y MÉTODOS	
II.1. MATERIAL .....	136
II.1.a. Aflatoxinas .....	136
II.1.b. Aparatos .....	136
II.1.c. Material de vidrio .....	137
II.1.d. Material para cromatografía en capa fina .....	138
II.1.e. Otros materiales .....	139
II.1.f. Reactivos .....	139
II.1.g. Medios de cultivo .....	140
II.1.h. Material utilizado para fabricación del queso Madurado .....	144
II.2. LUGAR DE TRABAJO .....	149
II.3. PRECAUCIONES EN EL MANEJO DE LAS AFLATOXINAS .....	149
II.4. CEPAS AFLATOXIGÉNICAS DE COLECCIÓN .....	151
II.5. TÉCNICAS DE DETERMINACIÓN DE AFLATOXINAS EN LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS .....	153
II.5.a. Introducción .....	153
II.5.b. Muestra patrón .....	155
II.5.c. Técnica propia (Técnica I) .....	156
II.5.c.1. Leche .....	156
II.5.c.2. Yogur .....	167
II.5.c.3. Queso .....	167
II.5.d. Técnica de Lafont et al. ....	168
II.5.e. Técnica de Tripet et al. ....	170
II.5.f. Técnica de Stubblefield .....	173

- IV -

II.5.g. Técnica propia (Técnica II) .....	177
II.6. DETERMINACION DE AFLATOXINAS EN MUESTRAS DE LECHE COMERCIAL .....	184
II.7. PRODUCCION DE AFLATOXINAS SOBRE YOGUR .....	185
II.7.a. Determinación del crecimiento fúngico sobre el yogur .....	186
II.7.b. Determinación de aflatoxinas en micelio .....	187
II.7.c. Determinación de aflatoxinas en yogur .....	188
II.7.d. Producción de aflatoxinas sobre yogur comercial .	188
II.7.d.1. Inoculación .....	188
II.7.d.2. Incubación .....	189
II.7.e. Producción de aflatoxinas sobre yogur elaborado por nosotros .....	191
II.7.e.1. Proceso de fabricación del yogur .....	191
II.7.e.2. Inoculación .....	193
II.7.e.3. Incubación .....	193
II.8. INFLUENCIA DEL PROCESO DE ELABORACION DEL YOGUR SOBRE LA AFLATOXINA M <sub>1</sub> .....	199
II.8.a. Proceso de elaboración del yogur .....	199
II.8.b. Inoculación de las aflatoxinas .....	199
II.8.c. Extracción de aflatoxinas .....	200
II.9. PRODUCCION DE AFLATOXINAS SOBRE QUESO MADURADO .....	201
II.9.a. Proceso de fabricación del queso Madurado .....	201
II.9.b. Incubación y estudio .....	205
II.9.b.1. Inoculación .....	206
II.9.b.2. Toma de muestras .....	216
II.9.c. Determinación de aflatoxinas .....	218
II.10. INFLUENCIA DEL PROCESADO DEL QUESO MADURADO SOBRE SU CONTENIDO EN AFLATOXINAS .....	220
II.10.a. Introducción .....	220

II.10.b.1. Contaminación de la leche .....	221
II.10.b.2. Estudios efectuados .....	222
II.10.c. Lote 2 .....	226

### III. RESULTADOS

III.1. TECNICAS DE DETERMINACION DE AFLATOXINAS EN LECHE Y PRODUCTOS LACTEOS .....	231
III.2. DETERMINACION DE AFLATOXINAS EN MUESTRAS DE LECHE COMERCIAL .....	237
III.3. PRODUCCION DE AFLATOXINAS SOBRE YOGUR .....	243
III.3.a. Producción de aflatoxinas sobre yogur comercial. ....	243
III.3.a.1. Incubación en envase dañado a 28°C .....	243
III.3.a.2. Incubación en envase intacto a 28°C .....	249
III.3.a.3. Incubación en envase dañado a 15°C .....	257
III.3.a.4. Incubación en envase intacto a 15°C .....	261
III.3.a.5. Incubación en envase dañado a 10°C .....	264
III.3.b. Producción de aflatoxinas sobre yogur elaborado por nosotros .....	268
III.3.b.1. Proceso de elaboración destapado e incubación en envase dañado a 28°C .....	268
III.3.b.2. Proceso de elaboración destapado e incubación en envase dañado a 15°C .....	275
III.3.b.3. Proceso de elaboración destapado e incubación en envase dañado a 10°C .....	279
III.3.b.4. Proceso de elaboración destapado e incubación en envase dañado 24h a 28°C y después a 10°C .....	282
III.3.b.5. Proceso de elaboración destapado e incubación en envase intacto a 28°C .....	282
III.3.b.6. Proceso de elaboración destapado e incubación en envase intacto a 15°C .....	286
III.3.b.7. Proceso de elaboración tapado e incubación en envase intacto a 28°C .....	288
III.3.b.8. Proceso de elaboración tapado e incubación en envase intacto a 15°C .....	288
III.3.b.9. Inoculación posterior a la elaboración e incubación a 28°C .....	288

III.3.b.10. Inoculación posterior a la elaboración e incubación a 15°C .....	290
III.3.b.11. Proceso de elaboración destapado e incubación en envase dañado a 28°C, inoculando con la cepa <u>A.flavus</u> NRRL 3251 .....	301
III.3.b.12. Influencia del tamaño del inóculo sobre la producción de aflatoxinas en yogur .....	305
III.4. INFLUENCIA DEL PROCESO DE ELABORACION DEL YOGUR SOBRE LA AFLATOXINA M <sub>1</sub> .....	312
III.5. PRODUCCION DE AFLATOXINAS SOBRE QUESO MADURADO ....	314
III.5.a. Inoculación de la leche de partida con una suspensión de esporas .....	314
III.5.a.1. Estudio de la distribución de esporas durante el proceso de elaboración del queso Madurado. ....	314
III.5.a.2. Estudio de la producción de aflatoxinas ..	315
III.5.b. Inoculación de la superficie del queso con asa cargada .....	321
III.5.c. Inoculación en el centro del queso .....	329
III.5.d. Producción de aflatoxinas sobre porciones de queso .....	331
III.5.e. Producción de aflatoxinas sobre queso triturado..	333
III.5.f. Producción de aflatoxinas sobre pasta de queso. ....	333
III.6. INFLUENCIA DEL PROCESADO DEL QUESO MADURADO SOBRE SU CONTENIDO EN AFLATOXINAS .....	338
III.6.a. Lote 1 .....	338
III.6.a.1. Influencia de las aflatoxinas sobre las bacterias presentes en leche y cultivo iniciador ...	339
III.6.a.2. Influencia del proceso de elaboración del queso Madurado sobre las aflatoxinas presentes en la leche de partida .....	339
III.6.a.3. Influencia del periodo de maduración sobre las aflatoxinas presentes en queso Madurado ..	342
III.6.a.4. Influencia del almacenamiento en refrigeración sobre su contenido en aflatoxinas .....	344
III.6.a.5. Influencia del almacenamiento en congelación del queso Madurado sobre su contenido en aflatoxinas .....	346

III.6.b. Lote 2 .....	346
III.6.b.1. Influencia del proceso de elaboración del queso Madurado sobre las aflatoxinas presentes en la leche de partida .....	346
III.6.b.2. Influencia del periodo de maduración y almacenamiento en refrigeración sobre las aflatoxinas presentes en queso Madurado ..	349
III.6.b.3. Influencia del almacenamiento en congelación sobre las aflatoxinas presentes en queso Madurado .....	351

#### IV. DISCUSION

IV.1. PERDIDA DE LA CAPACIDAD AFLATOXICOGENICA POR CEPAS TOXICAS .....	354
IV.2. TECNICAS DE DETERMINACION DE AFLATOXINAS EN LECHE Y PRODUCTOS LACTEOS .....	356
IV.3. DETERMINACION DE AFLATOXINAS EN MUESTRAS DE LECHE COMERCIAL .....	361
IV.4. PRODUCCION DE AFLATOXINAS SOBRE YOGUR .....	365
IV.4.a. Yogur como sustrato para producción de aflatoxinas .....	365
IV.4.b. Influencia del proceso de elaboración del yogur sobre la producción de aflatoxinas .....	370
IV.4.c. Influencia del sustrato (yogur comercial o yogur elaborado por nosotros .....	371
IV.4.d. Influencia de las condiciones de elaboración del yogur (tapado o destapado) .....	372
IV.4.e. Influencia de las condiciones de incubación (en envase intacto o dañado) .....	374
IV.4.f. Influencia de la temperatura .....	375
IV.4.g. Variaciones a lo largo del periodo de incubación.	376
IV.4.h. Porcentaje de aflatoxinas B:G producidas .....	378
IV.4.i. Distribución de aflatoxinas en micelio/sustrato.	379
IV.4.j. Influencia de la cepa aflatoxicogénica .....	381
IV.4.k. Influencia del tamaño del inóculo .....	381



IV.5. INFLUENCIA DEL PROCESO DE ELABORACION DEL YOGUR SOBRE LA AFLATOXINA M <sub>1</sub> .....	383
IV.6. PRODUCCION DE AFLATOXINAS EN QUESO MADURADO .....	385
IV.6.a. Proceso de elaboración del queso Madurado.....	385
IV.6.b. Distribución de esporas fúngicas en suero y cuajada .....	387
IV.6.c. Producción experimental de aflatoxinas en queso Madurado .....	388
IV.6.d. Limpieza y parafinado de los quesos .....	399
IV.6.e. Tipo de inoculación .....	405
IV.6.f. Profundización de las aflatoxinas .....	406
IV.6.g. Producción B:G .....	410
IV.6.h. Pigmentación amarillenta del substrato .....	412
IV.7. AFLATOXINAS DURANTE EL PROCESADO DEL QUESO MADURADO.	414
IV.7.a. Contaminación de la leche con aflatoxinas ....	414
IV.7.b. Parafinado de los quesos .....	414
IV.7.c. Influencia de las aflatoxinas sobre la población bacteriana de la leche y el starter .....	415
IV.7.d. Influencia del proceso de elaboración del queso Madurado sobre las aflatoxinas .....	416
IV.7.e. Influencia del proceso de maduración sobre las aflatoxinas presentes en queso Madurado .....	427
IV.7.f. Influencia del almacenamiento en refrigeración sobre las aflatoxinas presentes en queso Madurado	430
IV.7.g. Influencia del almacenamiento en congelación sobre las aflatoxinas presentes en queso Madurado ..	434
V. CONCLUSIONES .....	436
VI. BIBLIOGRAFIA .....	443

## I. INTRODUCCION

La presencia de aflatoxinas en productos lácteos plantea una doble problemática:

a/ Por una parte la presencia de aflatoxinas en leche y productos lácteos como consecuencia de la ingestión, por parte del animal en periodo de lactación, de alimentos contaminados con aflatoxinas producidas por el hongo sobre ellos: en el organismo animal las aflatoxinas son metabolizadas a otros productos. Así, la  $B_1$  sufre un proceso de hidroxilación transformándose en  $M_1$ . Si ese animal se encuentra en periodo de lactación, ésta aparecerá en la leche y consecuentemente en los productos elaborados a partir de ella. A este proceso lo denominaremos contaminación indirecta de la leche. Además de  $M_1$ , se pueden encontrar en leche  $M_2$ ,  $GM_1$  y  $GM_2$ , derivadas respectivamente de  $B_2$ ,  $G_1$  y  $G_2$ . En la figura 1.1 se muestra la estructura química de cada una de estas aflatoxinas.

En el presente trabajo nos referiremos fundamentalmente a la aflatoxina  $M_1$  por ser cuantitativamente la más representativa, ya que de todas las aflatoxinas, es la  $B_1$  la más abundante en la naturaleza, y por tanto su hidroxiderivado será el más frecuentemente identificado en la

Figura I.1 .- Estructura química de las principales aflatoxinas

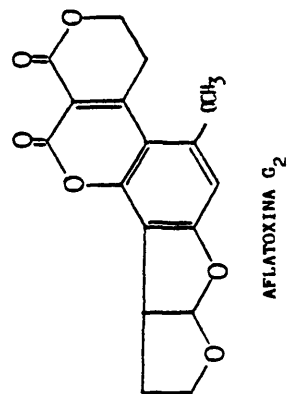
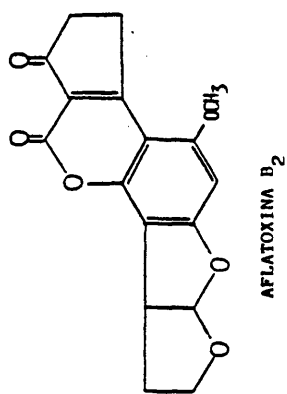
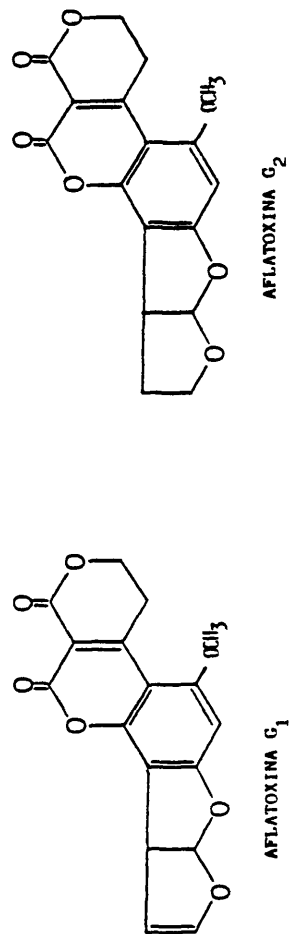
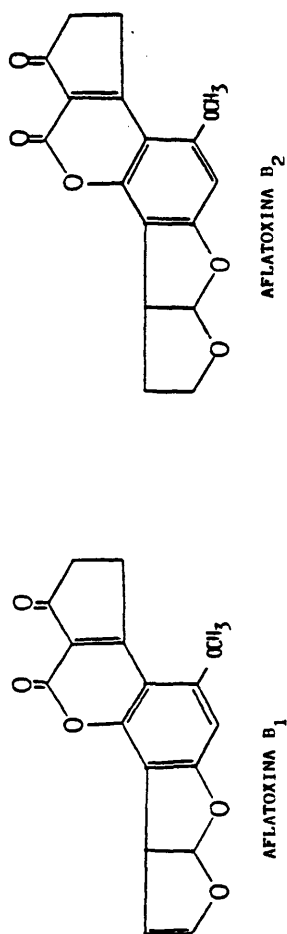
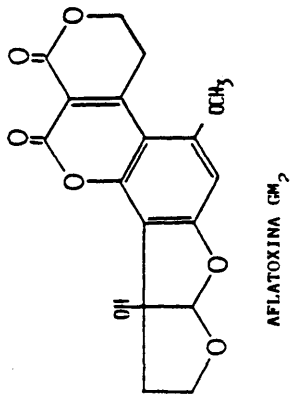
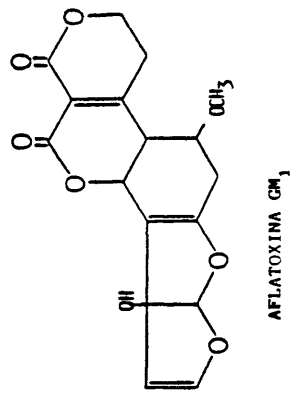
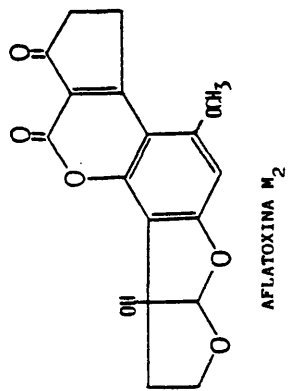
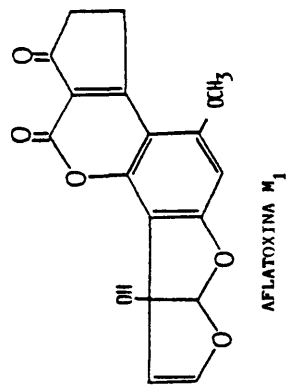


Figura I.1 .- Continuación



leche.

b/ Asimismo, se pueden encontrar aflatoxinas en la leche y productos lácteos por haber sido producidas en ellos tras la contaminación y crecimiento de hongos aflatoxicogénicos. En este caso el grado de contaminación suele ser muy superior al caso anterior, y constituye lo que denominaremos como contaminación directa de la leche.

#### I.1. CONTAMINACION INDIRECTA DE LA LECHE Y PRODUCTOS LACTEOS POR AFLATOXINAS

La forma de contaminación indirecta de productos lácteos practicamente sólo ha sido estudiada para M<sub>1</sub>, ya que como se ha indicado es el principal metabolito de aflatoxinas eliminado por la leche.

#### I.1.a. Transformación de aflatoxina $B_1$ en $M_1$

La presencia de aflatoxina  $M_1$  en leche es proporcional al nivel de ingestión de  $B_1$ , en un grado variable, como ha sido descrito por diversos autores y podemos apreciar en la tabla I.1. En ella se puede comprobar que la mayor parte de los valores descritos en la literatura oscilan entre 0.5 y 3 % de la toxina ingerida, quedando como excepción los datos de Ferrando et al. (109) y Applebaum et al. (12), que señalan un nivel muy superior, con una aparición de  $M_1$  en leche del 6-11.7 % de la  $B_1$  ingerida.

En distintas experiencias se ha comprobado que después de la ingestión de una dosis única de  $B_1$ , la excreción de  $M_1$  en leche comienza a las 12-24 horas y desaparece a los 3-5 días (171, 206, 217, 237, 346). Si bien hay autores que no dudan en señalar que este producto se puede detectar en leche a las 5 horas de la ingestión de  $B_1$  (105).

En general puede decirse que un 85% de las aflatoxinas totales son excretadas en las primeras 48 horas (237).

Asimismo, puede afirmarse que de toda la aflatoxina ingerida, sólo un 4.52% es excretada por distintas vías: 1.55% en orina, 2.79% en heces y 0.18% en leche (206). La mayor parte de la aflatoxina ingerida es alterada por enzimas citoplásmicas y microsomales en las células hepáticas para formar productos de oxidación ( $M_1$ ) o de reducción (aflatoxicol), permaneciendo una pequeña fracción de la

Tabla I.1 .- Grado de aparición de aflatoxina  $M_1$  en leche en relación a la  $B_1$  ingerida según datos de diversos autores

$B_1 - M_1$	Autores
<1 %	Van der Linde et al., 1965
0.35 %	Allcroft et al., 1968
1 %	Fehr et al., 1968
0.87-3.94 %	Masri et al., 1969
<5 %	Brewington et al., 1970
0.35 %	Lynch, 1972
1.39 %	Neumann-Kleinpaul y Terplan, 1973
0.27 %	Kiermeier, 1973
0.43-1.38 %	McKinney et al., 1973
0.17-0.3 %	Polan et al., 1974
0.35 %	Moreau, 1976
0.4 %	Van Egmond et al., 1977
1.5 %	Sieber y Blanc, 1978
<0.6 %	Engel y Hagemeister, 1978
<1 %	Lafont et al., 1980
1.89-2.64 %	Patterson et al., 1980
0.5 - 3 %	Blanc y Karleskind, 1981
0.3 - 1 %	Tripet et al., 1981
6 -11.7 %	Applebaum et al., 1982



Tabla I.1 .- (Continuación)

$B_1 - M_1$	Autores
1 - 3 %	Heeschen et al., 1983
<1.5 %	Paul y Thurm
1 - 3 %	Ranfft, 1983
1 - 4 %	Van Egmond, 1983
1.7-2.5 %	Viroben et al., 1983
1 %	Cohen et al., 1984
6 -11.7 %	Ferrando et al., 1984
1.08 %	Fremy y Quillardet, 1985
0.9-1.6 %	Price et al., 1985

aflatoxina administrada sin alterar (346).

Otro factor a tener en cuenta es el grado de destrucción de la toxina durante el proceso de la digestión, que Engel y Hagemeyer (105) sitúan alrededor del 95% para los rumiantes en experiencias realizadas in vitro con contenido de rumen, absorbiéndose solamente de un 2-5% de la toxina ingerida.

No obstante, debe tenerse en cuenta que todos estos resultados han sido recogidos en condiciones experimentales, y que en la práctica raramente suele ingerirse la aflatoxina B<sub>1</sub> en una dosis única, sino que dicha ingestión es más normal que se repita por el consumo de un alimento contaminado.

En vista de los niveles de transformación B<sub>1</sub>-M<sub>1</sub>, diversos autores han especulado con el grado de aparición de M<sub>1</sub> en leche:

Así, Heeschen et al. (141) describen que si un alimento contiene 20 µg/Kg de B<sub>1</sub>, con una ración diaria de 10 Kg, corresponde una ingesta de 200.000 ng de B<sub>1</sub>; suponiendo un porcentaje de transformación B<sub>1</sub>-M<sub>1</sub> del 3%, daría lugar a un residuo de M<sub>1</sub> en la leche de hasta 300 ng/Kg, considerando una producción diaria de leche de 20 Kg.

Por otra parte, para Sieber y Blanc (339) suponiendo que un alimento contenga 10 µg/Kg de B<sub>1</sub>, con una ingesta diaria de 5Kg y una producción de 10 Kg de leche, metabolizándose un 1-3% de la B<sub>1</sub> suministrada, tendríamos una cantidad de M<sub>1</sub> en leche de 0.05-0.15 µg/Kg.

Para Van Egmond et al. (379), suponiendo una ingestión diaria de B Kg de alimento concentrado contaminado con 20 µg/Kg de B<sub>1</sub>

y una producción de 25 Kg de leche, la concentración de  $M_1$  en ésta sería del orden de 0.02-0.2  $\mu\text{g/Kg}$ .

Como se puede deducir son varios los parámetros que van a influir en la cantidad de  $M_1$  presente en la leche y así podemos citar:

1) Factores dependientes de la alimentación:

- Ración del alimento contaminado que es consumida diariamente.
- Características del alimento ingerido en cuanto a calidad y preparación (140).
- El grado de conversión  $B_1-M_1$  por el organismo de la vaca parece ser ligeramente más activo cuando la ingestión es continuada durante varios meses (164).

2) Factores dependientes del animal:

- Nivel de producción láctea.
- Momento de la lactación en que se encuentra el animal. Lafont et al. (192) detectan un grado de transformación  $B_1-M_1$  del 0.78% en el comienzo de la lactación y de sólo un 0.22% al final de la misma.
- Especie, raza e individuo: Así, en la oveja la excreción de  $M_1$  por orina y heces es más precoz y en menor cantidad que en la vaca, excretando por contra mucha más  $B_1$  que no ha sido metabolizada. Se ha sugerido también que vacas muy productoras secretan una mayor cantidad de  $M_1$  en su leche debido a su más activo metabolismo (278). También existe un

componente individual por cuanto varía de un animal a otro dependiendo de su comportamiento metabólico (261, Kiermeier citado en 217).

- Refiriéndonos a un mismo animal, puede variar de un día a otro y de una lactación a otra (261).

### 3) Factores ambientales:

- Momento del día: Se encuentra mas  $M_1$  en la leche recogida en la tarde que en la de la mañana, presumiblemente por el más bajo metabolismo que se produce durante el periodo de descanso nocturno (354).

- Higiene de los animales y estación del año (140).

- Dosis mínima de aflatoxina consumida. Se debe alcanzar un valor mínimo de  $B_1$  para dar lugar a la aparición de  $M_1$  en leche.

- Grado de contaminación: Para Sieber y Blanc (339), dependiendo de la dosis ingerida, se puede prolongar el tiempo de excreción hasta incluso 9 días a partir del momento de la ingesta.

Finalmente, indicar que  $M_1$  es el principal metabolito de  $B_1$ , pero no el único; el resto son de poca significación en vista de su baja toxicidad y su presencia limitada en leche.

#### I.1.b. Presencia de aflatoxina M<sub>1</sub> en leche y productos lácteos

En la tabla I.2 se puede apreciar una relación de distintos estudios llevados a cabo hasta el momento sobre la presencia de aflatoxina M<sub>1</sub> en leche y productos lácteos, ordenados cronológicamente y especificando el país en que se realizó el estudio, las muestras analizadas y el porcentaje de positivas en cada caso, así como el nivel máximo y mínimo de aflatoxinas detectado en cada una de las experiencias realizadas.

A la luz de estas investigaciones se pueden hacer una serie de consideraciones:

\* En primer lugar, existe una clara diferencia estacional en cuanto a la aparición de M<sub>1</sub> en productos lácteos. Son varios los autores que analizaron las muestras agrupándolas según la época del año en que se obtuvieron, encontrando un mayor grado de contaminación en las leches muestreadas durante el invierno que en las obtenidas en verano (34, 117, 118, 120, 140, 161, 171, 184, 261, 268, 273, 339, 410).

Kiermeier (171) encontró 12 muestras positivas de 36 en el periodo Febrero-Abril, 9 de 12 en Mayo, 7 de 7 en Febrero - Marzo y ninguna de 6 en Junio, que es la época que coincide

Tabla I.2 .- Presencia de aflatoxina M<sub>1</sub> en leche y productos lácteos en estudios efectuados en distintos países.

País	Producto lácteo	MUESTRAS			Nivel de aflatoxinas µg/L ó µg/Kg		Autores
		Analizadas	Positivas	%	Mínimo	Máximo	
Gran Bretaña	Leche	19	0	0	-	-	Allicroft y Carnaghan, 1963
Sudáfrica	Leche	21	5	24	0.02	0.2	Purchase y Vorster, 1968
USA	Leche en polvo	20	0	0	1		Brewington et al., 1970
Francia	Queso	150	0	0	-	-	Jacquet et al., 1971
RFA	(de explotación)	36	12	33.3	0.04	0.25	Kiermeier y Mücke, 1972
	LECHE (de Central)	12	9	75	0.04	0.08	
	(comercial)	7	7	100	0.05	0.13	
Turquía	Varios	334	0	0	0.1	-	Demir, 1973
RFA	Leche cruda	61	28	45.9	0.04	0.25	Kiermeier, 1973
RFA	Varios	116	8	6.89	0.67	2	Neumann-Kleinpaul y Terplan, 1973
Polonia	Leche	21	0	0	0.025	-	Lemieszek, 1974
	Leche en polvo	13	0	0	0.5	-	
RFA	Leche cruda	165	29	17.5	0.04	-	Kiermeier et al., 1975
Noruega	Leche en polvo	15	0	0	-	-	Indestad y Underdal, 1975
India	Leche	81	5	6.17	-	13.3	Paul et al., 1976
Irán	Leche	95	38	40	0.05	0.5	Suzanger et al., 1976
DDR	Leche	24	4	16.6	1.7	6.5	Fritz et al., 1977
España	Leche natural	1150	72	6.26	0.05	-	Jodral, 1977
	Leche esterilizada						
	y Leche en polvo	407	0	0	0.05	-	
Holanda	Leche	68	42	62	0.01	0.5	Van Pée et al., 1977
RFA	Queso	197	136	69	0.02	0.123	Kiermeier et al., 1977
RFA	Leche	419	79	19	0.02	0.54	Kiermeier et al., 1977
Polonia	Leche	44	0	0	0.05	-	Lemieszek, 1977
	Leche	260	117	45	0.05	0.5	
	Leche en polvo	41	29	73	0.2	2	
	Yogur	54	44	82	0.2	-	
	Queso Fresco	80	27	34	0.23	-	
RFA	Camembert	65	33	51	0.31	-	Polzhofer, 1977
	Queso Curado	77	57	75	0.43	1.3	
	Queso para fundir	134	53	40	0.26	-	
USA	Varios	320	25	8	0.05	0.5	Rodricks y Stoloff, 1977

Tabla I.2 .- (Continuación)

País	Producto lácteo	MUESTRAS			Nivel de aflatoxinas µg/L ó µg/Kg		Autores
		Analizadas	Positivas	S	Mínimo	Máximo	
Francia	Queso	100	1	1	2.5	-	Corbion y Frey, 1978
RFA	Leche	419	79	18.9	0.02	0.54	Weiss et al., 1978
	Queso	197	136	69	0.02	0.23	
Checoslovaquia	Queso	-	-	70	0.09	-	Doncheva y Bonchev, 1978
Gran Bretaña	Leche	278	41	15	0.03	0.52	Glancy, 1978
Checoslovaquia	Queso	54	12	24	0.004	0.01	Bartos y Matyas, 1979
Australia	Leche	33	0	0	0.1	-	Dulley y Moulhan, 1979
	Queso	-	-	-	-	-	
Japón	Leche	198	0	0	-	-	Saito et al., 1979
	Queso	83	13	15.6	0.2	1.3	
Suiza	Leche	38	2	5	0.012	0.05	Knutti et al., 1979
Yugoslavia	Leche	105	5	4.76	-	2.5	Sutic et al., 1979
Suiza	Leche	91	91	100	0.001	0.05	Zimmerli y Blaser, 1979
Francia	Lactosuero	86	36	41.86	-	5	Frey y Gaymard, 1980
Italia	Leche	50	1	2	0.4	-	Maffeo et al., 1980
Egipto	Varios	334	13	3.89	0.2	0.4	Mahrous et al., 1980
Austria	Leche en polvo	210	8	3.8	0.2	-	Pfleger y Brandl, 1980
		837	468	56	0.03	0.69	
USA	Leche	302	157	52	0.1	4	Stoloff, 1980
Japón	Queso	?	9	?	0.4	1.1	Saito et al., 1980
Checoslovaquia	Varios	141	35	24.8	-	-	Bartos y Matyas, 1980
	Leche	380	168	44	0.05	1.15	
	Leche en polvo	222	129	58	0.05	5.2	
	Queso	343	102	29.7	-	2.15	
	Queso	26	2	8	-	0.15	
Francia	Manterquilla	22	6	27	-	0.55	Blanc y Karleskind, 1981
	Lactosuero	12	5	40	-	2.25	
	Leche concentrada	5	1	20	-	0.25	
	Nata Nata	4	2	50	-	0.35	
	Caseinatos	-	-	-	-	-	
Brasil	Leche	6	3	50	0.025	50	Della Rosa y Moraes, 1981
Italia	Leche	31	5	16.1	0.03	0.07	Castelli y Riberzani, 1981
	Leche en polvo	21	4	19	0.03	0.25	
	Queso	6	5	83	0.05	0.4	
DDR	Leche	60	4	7	0.1	6.5	Fritz y Engst, 1981
Francia	Leche	102	32	31.3	0.5	5	Frey et al., 1981
RFA	Leche	381	?	?	0.002	0.067	Meeschen et al., 1981
Italia	Leche	160	0	0	-	-	Maffeo y Leali, 1981

Tabla I.2 .- (Continuación)

País	Producto lácteo	MUESTRAS			Nivel de aflatoxinas µg/L ó µg/Kg		Autores
		Analizadas	Positivas	%	Mínimo	Máximo	
Egipto	Varios	14	9	64.28	2.04	7.22	Marshaly et al., 1981
India	Leche	71	3	4.22	0.71	3.37	Patel et al., 1981
USA	Varios	992	1	0.1	0.3	-	Stoloff et al., 1981
Suiza	Leche	78-79 163	16	8.6	0.05	2	Tripet et al., 1981
	Queso	79-80 230	40	17.8	0.05	3	
		91	33	37	0.5	-	
Checoslovaquia	Leche	77	5	6.49	Traza	0.38	Bartos y Matyas, 1981
Polonia	Leche	22	11	50	0.01	0.25	Gajek et al., 1982
Irán	Leche	52	48	92.31	-	23	Karim et al., 1982
	Leche pasteurizada	9	9	100	-	20.1	
Irán	Queso	8	7	97.5	-	-	Parvaneh et al., 1982
Checoslovaquia	Leche	67	9	13.43	0.05	0.1	Vesela et al., 1982
Francia	Varios	1979 86	61	70.9	0.01	0.5	Frey et al., 1982
		1980 102	53	51.96	0.01	0.5	
		1981 218	124	56.8	0.01	0.5	
		1982 159	15	9.43	0.01	0.1	
España	Leche	95	7	7.3	0.02	0.04	Burdaspal et al., 1983
DDR	Leche	142	0	0	0.04	-	Paul y Thurm, 1983
	Leche en polvo	70	2	2.85	0.5	-	
RFA	Leche en polvo	95	47	49.4	0.1	2.55	Ranfft, 1983
Italia	Varios	267	180	67.41	0.02	0.1	Riberzani et al., 1983
Polonia	Leche	250	0	0	-	-	Czerwinski, 1983
Checoslovaquia	Queso	29	6	20.68	0.005	0.066	Brezina et al., 1983
USA	Leche	1978 816	554	68	0.1	2	Coopedge, 1983
		1979 912	116	13	0.1	2	
		1980 624	144	23	0.1	2	
		1981 847	107	13	0.1	2	
		1982 786	235	30	0.1	2	
		1983 168	99	59	0.1	2	
Italia	Queso	50	4	8	0.05	0.1	Finoli et al., 1983
Suecia	Leche	84	1	1.19	0.05	0.1	Moller y Andersson, 1983
		13	13	100	0.005	0.036	
Holanda	Leche	1981 105	84	80	0.015	0.09	Schudeboom, 1983
		1982 462	83	17.9	0.2	-	
Yugoslavia	Leche	34	0	0	-	-	Sarinjar et al., 1983
Gran Bretaña	Leche en polvo	277	5	2	-	0.03	Gilbert et al., 1984
	Leche	409	24	6	-	0.01	



Tabla I.2 .- (Continuación)

País	Producto lácteo	MUESTRAS			Nivel de aflatoxinas µg/L ó µg/Kg		Autores	
		Analizados	Positivas	%	Mínimo	Máximo		
Japón	Queso	1980	126	56	44.4	0.11	0.3	Hisada et al., 1984
		1981	128	111	86.7	0.025	1.06	
		1982	32	13	40.6	0.012	0.252	
		1983	132	120	90.9	0.01	0.5	
Italia	Leche	160	0	0	-	-	Pompa et al., 1984	
Gran Bretaña	Leche	1979	268	201	75	0.1	-	Watson, 1984
		1983	277	13	5	0.1	-	
Japón	Queso	79	17	21.5	-	-	Wishijima, 1984	
Italia	Varios	70	40	57.14	0.1	1.14	Quintavalla y Casolari, 1985	
Brasil	Leche (comercial) (granja)	100	1	1	-	-	Sabino et al., 1985	
		50	?	?	0.1	1.68		
Italia	Leche	106	76	71.6	0.04	0.48	Visconti et al., 1985	
Grecia	Queso	94	0	0	-	-	Zerfiridis, 1985	
Italia	Leche	82	37	45.5	0.003	0.05	Piva et al., 1985	
	Queso	83	70	85.5	0.003	0.25		

con el pastoreo de los animales.

Jodral (161) detectó en la región andaluza 15.2% muestras positivas en invierno, 8.5% en primavera y ninguna en verano y otoño.

Kiermeier et al. (184) describieron que la contaminación desciende desde principios de Mayo a finales de Junio de un 70 a un 40%, coincidiendo con la época de pastoreo.

Polzhofer (273) describió en leche de invierno (Noviembre a Mayo) un 70% de muestras positivas, y en leche de verano (Junio a Octubre) solo un 20%

Fremy et al. (118) detectaron un 45% de muestras positivas en leche de invierno, y 24% en leche de verano.

Esta circunstancia es explicada por la mayoría de los autores basándose en que la aflatoxina B<sub>1</sub> ingerida por los animales va vehiculada fundamentalmente en los alimentos compuestos, y concretamente por la incorporación a éstos de harinas de cacahuete y algodón; también puede ser que este tipo de alimentos pueda enmohecerse durante su almacenamiento en la propia granja. Al constituir estos productos la dieta básica en el invierno y no suministrarse o hacerlo en pequeña cantidad durante la primavera y verano por coincidir con la época de pastoreo, parece lógico pensar que sea en esta época (verano) cuando se produzcan los mínimos niveles de M<sub>1</sub> en leche.

Por contra, existen años en que es en los meses de Agosto o Septiembre cuando se detecta una mayor presencia de M<sub>1</sub> en la leche. Este fenómeno suele producirse en aquellos años

excesivamente secos, en que se agota pronto el pasto, teniendo que recurrirse a la alimentación del ganado con piensos compuestos, que como se ha dicho constituyen el sustrato adecuado para la incorporación de micotoxinas en la alimentación del ganado.

\* Otro factor a considerar es el límite de detección de las técnicas analíticas empleadas. Lógicamente, la disminución del límite de detección a que el empleo de nuevas técnicas ha conllevado permite la obtención de un mayor número de muestras positivas, sin que ello signifique que actualmente la leche esté más contaminada (296). Buena prueba de esto son las experiencias de Moller y Andersson (236) en Suecia, quienes utilizando una técnica con un límite de detección de 0.05 ppb (parte por billón americano) solamente detectan una muestra positiva de 84 analizadas, mientras que con un límite de 0.005 ppb detectan 13 de 13. También Pfleger y Brandl (268) en Austria detectaron sólo 8 muestras positivas de 210 con un límite de 0.2 ppb, mientras que con un límite de 0.03 ppb llegan a detectar 468 de 837.

\* Por otra parte, se debe tener en cuenta el tipo de producto lácteo analizado. En productos lácteos desecados, como la leche o suero en polvo, se detectarán más muestras positivas por el efecto de concentración de la toxina que se produce (34); de esta forma, se pueden detectar

contaminaciones que en el producto líquido pasarían desapercibidas (120).

Dentro de los quesos, en principio se detectará mayor nivel de aflatoxinas en quesos duros por su mayor contenido en masa seca (184).

Todos estos razonamientos teóricos en muchas ocasiones no se ven acompañados por los resultados obtenidos. Así, por ejemplo, Bartos y Matyas (20) describieron mayor nivel de contaminación en quesos blandos que en duros.

\* Asimismo, debemos considerar las medidas precautorias e higiénicas que van apareciendo en los distintos países y que hacen disminuir el número de muestras positivas, y sobre todo, el nivel máximo de contaminación, así como un mayor grado de sensibilización de los ganaderos a la hora de alimentar a sus animales con productos higiénica y sanitariamente correctos.

Así, en Suiza se estableció en 1981 la prohibición de alimentar el ganado lechero con tortas de cacahuete, lo que hizo disminuir significativamente la aparición de  $M_1$  en leche (367).

En Francia, debido a los altos porcentajes de contaminación que estaban siendo detectados, se estableció un riguroso control de los productos lácteos, lo que se tradujo en una considerable disminución de  $M_1$  (117).

En 1982, Van Egmond en Holanda (377) detectó un nivel máximo de  $M_1$  en leche de 0.09 ppb, mientras que en 1972 se había

detectado un 18% de las muestras con un contenido en  $M_1$  superior a 0.1 ppb.

\* Se deben considerar las diferencias climáticas entre los distintos países, e incluso entre distintas regiones dentro de un país. Jodral (161) hace responsable de la baja contaminación por  $M_1$  en leches españolas a las temperaturas extremas que existen durante el verano y el otoño, y a la humedad relativa muy baja, que dificultaría el enmohecimiento del alimento destinado al ganado lechero.

\* A la hora de interpretar los resultados sobre el nivel de contaminación de la leche y productos lácteos de un país debe tenerse en cuenta el proceso de mezcla de leche de distintos orígenes que sufre este producto a nivel industrial, que hace que se detecte un mayor número de muestras positivas pero con un menor nivel de contaminación (125, 161).

#### I.1.c. Contaminación indirecta del queso por aflatoxinas

I.1.c.1. Influencia del procesado del queso sobre la aflatoxina  $M_1$  presente en la leche de partida

Los primeros estudios en este sentido vinieron acompañados de un alto grado de confusión, por cuanto los datos publicados por distintos autores mostraban una evidente contradicción. Así, Allcroft y Carnaghan (7) encontraron  $M_1$  únicamente en la fracción caseínica de queso precipitado con renina a partir de leche naturalmente contaminada; McKinney et al. (228) describieron una distribución suero/cuajada de 20/80, aunque debe tenerse en cuenta que estos autores no detectaron más que el 50% de la  $M_1$  añadida, mientras que Purchase et al. (283) en queso obtenido por precipitación con ácido láctico a partir de leche naturalmente contaminada, recuperaron toda la  $M_1$  en la fracción de suero, y nada en cuajada, con una pérdida en  $M_1$  durante el proceso del 58%, debido según los autores a que la leche había sido sometida a un proceso de pasteurización. Siguiendo una metodología similar a la de estos últimos autores, pero con leche artificialmente contaminada, Grant y Carlson (132) encontraron la aflatoxina  $M_1$  distribuida uniformemente en el suero y la cuajada: 40/50.

A partir de estas primeras experiencias, se intentó controlar más las condiciones de las mismas, obteniéndose distintos resultados según el tipo de queso, el tipo de leche y la forma de contaminación.

Stubblefield y Shannon (355) prepararon queso a partir de leche naturalmente contaminada. La totalidad de la aflatoxina  $M_1$  recuperada (fracción líquida + fracción sólida) variaba

del 88 al 111%; En quesos precipitados con renina (Colby, Cheddar y Swiss) encontraron aproximadamente la misma cantidad total de  $M_1$  en suero y cuajada. En Cottage precipitado por bacterias ácido lácticas la distribución suero/cuajada resultó ser de 71/40. En queso Blanco, al que se incorporan ácidos (láctico y/o acético), la distribución fué homogénea en suero y cuajada. En queso Ricotta la cantidad de  $M_1$  recuperada en el suero fue muy superior a la de la cuajada: 74/30; la cuajada de este queso es pequeña y granular, lo que puede explicar su bajo contenido en  $M_1$ ; sin embargo tiene un alto contenido en humedad, que en teoría debía producir el efecto contrario.

También en queso Ricotta, Wilson y Hayes (citado en 11) describieron una distribución 70/30.

Stoloff et al. (350) a partir de leche artificialmente contaminada elaboraron Cottage, con una pérdida en  $M_1$  del 20% durante el proceso de elaboración, recuperando el 86% de la misma en el suero.

Kiermeier y Buchner (178) procedieron a la elaboración de quesos Tilsit, Camembert y Fresco, recuperando  $M_1$  en un 94-99%, con distribución suero/cuajada en cada queso: 46.2/47.5, 41.7/57.2 y 38.5/59.4 respectivamente.

Estos mismos autores (177) investigaron distintas condiciones y factores que pudieran influir sobre la distribución de la

aflatoxina  $M_1$  en suero y cuajada, deduciendo que no existe relación entre el reparto de  $M_1$  y la cantidad de cuajo o tiempo de cuajado. En cambio, sí encontraron influencia en cuanto a la temperatura de cuajado, disminuyendo la cantidad de  $M_1$  presente en la cuajada al incrementar la misma. Este factor sin embargo no tiene mucha importancia práctica, por cuanto que la temperatura de cuajado para la mayoría de los quesos es 28-35°C. Tampoco observaron diferencias apreciables si el queso era obtenido mediante la utilización de cuajo o por precipitación ácida.

Van Egmond et al. (379) no encontraron pérdidas en el proceso de elaboración de queso Gouda, con un grado de distribución 53/47 en suero/cuajada.

Freymy y Roiland (122) en queso Camembert elaborado a partir de leche artificialmente contaminada con  $M_1$  disuelta en etanol, no describieron pérdidas apreciables (un 10% aproximadamente). Investigaron la influencia del grado de contaminación sobre el reparto de  $M_1$  en suero/cuajada, distribuyéndose la toxina en mayor medida en la cuajada cuanto menor era el grado de contaminación. Llegaron a detectar un 6% de  $M_1$  en la salmuera, que podría explicar las pérdidas que se producen en dicha toxina.

McKinney y Cavanagh (227) investigaron la influencia que sobre estos estudios podría tener el método de extracción de aflatoxinas empleado: encontraron una distribución



suero/cuajada de 25/75 al utilizar un determinado método analítico, y de 60.4/39.6 al emplear otro, lo que indica lo importante que es la elección de un método fiable y el referirse a las pérdidas sufridas en aflatoxinas durante el proceso de elaboración del queso.

#### I.1.c.2. Unión $M_1$ -caseína

Como hemos podido apreciar, la mayor parte de los autores describen una distribución de  $M_1$  aproximadamente igual en suero/cuajada en cuanto a cantidades totales, lo cual supone que por unidad de peso o volumen se produce un enriquecimiento evidente de la cuajada con respecto a la leche de partida, al que además habrá que sumar la concentración producida por la pérdida de agua que sufre el queso en su proceso de maduración.

Dos son las circunstancias que se cree influyen en esta distribución de la aflatoxina  $M_1$  durante la elaboración del queso: por una parte la insolubilidad de las aflatoxinas en la grasa de la leche y por otra su posible unión a alguna sustancia de la cuajada (346).

Ya McKinney et al. (227) dedujeron que debía existir algún tipo de afinidad entre  $M_1$  y caseína. Allcroft y Carnaghan (7) supusieron que más que una verdadera unión, se trataría de una adsorción de  $M_1$  a la caseína. Stubblefield y Shannon

(355) sostienen que la unión, si es que existe, es mínima.

Desde entonces se han realizado diversas experiencias intentando probar la existencia de esta unión. Así, Kiermeier y Buchner (178) precipitaron la caseína y otras proteínas de la leche con ácido láctico y ácido sulfosalicílico, comprobando la existencia de la unión  $M_1$ -caseína, aunque no llegaron a explicar su naturaleza.

Brackett y Marth (42) colocaron leche ultrafiltrada conteniendo  $M_1$  en diálisis de equilibrio con leche ultrafiltrada + caseína; tras 24h a 7°C, la porción de leche con caseína contenía 2.5-2.9 veces más  $M_1$ . También trataron leche naturalmente contaminada con un enzima proteolítico, obteniendo un 30.7% más de aflatoxina en la leche tratada que en la no tratada. Concluyeron que la unión  $M_1$ -caseína es evidente, pero sin embargo existe un límite de la cantidad de dicha toxina que se puede unir, y esto explicaría por qué el porcentaje de toxina recuperada a partir de la cuajada disminuye proporcionalmente con el incremento de la concentración de la misma.

Según estos mismos autores (41) puede deducirse que la aflatoxina  $M_1$  no está unida covalentemente a la caseína, toda vez que puede ser extraída; por tanto, esta unión podría producirse por interacciones entre zonas hidrofóbicas de la molécula de  $M_1$  y regiones hidrofóbicas de la molécula de caseína. Las reacciones de proteólisis podrían provocar la

destrucción de estas zonas hidrofóbicas de la molécula de caseína, y de esta manera ser más fácilmente extraíble la  $M_1$ .

Blanc et al. (32) en leche contaminada artificialmente, estudiaron la unión  $M_1$ -caseína por tratamiento de la leche con presión (similar al proceso de elaboración del queso), centrifugación y tratamiento ácido. Por otra parte, por proteólisis no encontraron diferencia entre la  $M_1$  detectada en muestras de leche tratadas y no tratadas con pepsina y pancreatina. Por fraccionamiento de las proteínas lactoséricas sobre Sephadex no detectaron  $M_1$  en las porciones de Inmunoglobulinas, Lactoglobulinas, Lactoalbúminas; sólo se detectó en la fracción de nitrógeno no proteico. De todas estas experiencias los autores concluyen que existe una cierta afinidad  $M_1$ -caseína, aunque no pueden precisar su naturaleza; especulan que es posible que el grupo hidroxil en posición 4, así como los grupos ceto y lactona constituyan las zonas reactivas, permitiendo, por medio de puentes de hidrógeno, la unión a algunos aminoácidos de la caseína y proteínas lactoséricas, e incluso péptidos y aminoácidos libres. Podría ser igualmente que se produjeran fuerzas de cohesión debidas a fuerzas de van der Waals.

I.1.c.3. Influencia del madurado y almacenamiento del queso sobre las aflatoxinas

Con respecto a las aflatoxinas B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub>, Kiermeier y Rumpf (183) estudiaron la influencia que sobre ellas tendría el almacenamiento del queso fundido, resultando ser estables durante 4 semanas a 20°C.

Lieu y Bullerman (200) demostraron la estabilidad de B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub> durante el almacenamiento de queso Swiss 168h a 5°C.

El resto de los trabajos consultados hacen referencia únicamente a la aflatoxina M<sub>1</sub>.

Kiermeier y Buchner (178) estudiaron la influencia que el madurado de los quesos Camembert, Tilsit y Fresco podría tener sobre la aflatoxina M<sub>1</sub>. Del resultado de sus investigaciones se deduce un incremento notable en la cantidad de aflatoxina presente: 45-54%, 22.6% y 23-28% respectivamente. A este respecto, se sabe que en el queso madurado disminuye la masa seca, pero esto no explicaría un incremento en toxina tan considerable; la explicación podría ser que M<sub>1</sub> se encontraría en leche y queso de forma combinada (soluble en agua y no extraíble por cloroformo), mientras que sería detectable durante la maduración a través de la eliminación de esta unión. En el queso Camembert, el contenido en M<sub>1</sub> de la corteza disminuye un 13% por el salado; esta diferencia se mantiene durante todo el madurado, no siendo compensada por difusión de la toxina. Esta diferencia entre corteza y parte interna no se observa sin embargo en el queso Tilsit; en éste, se aprecia un incremento de M<sub>1</sub> en la

corteza del 21%, paralelo a la pérdida de agua que se produce.

Brackett et al. (40) describieron la estabilidad de la aflatoxina  $M_1$  durante el madurado y el almacenamiento 26 semanas de quesos Brick y Limburger. En los madurados durante 2 y 3 semanas se apreciaba más  $M_1$  en la corteza que en el centro del queso; en los madurados durante 4 semanas sucedía lo contrario, lo cual no debe sorprender por cuanto que al cabo de este tiempo se notó un olor a amoníaco, resultante de la proteólisis, y por distintas experiencias se sabe que este compuesto es capaz de degradar las aflatoxinas. En general, se notó un ligero incremento en  $M_1$ , atribuible a una mejor recuperación analítica; también podrían influir la acción proteolítica y la disminución del contenido en humedad.

Estos mismos autores describieron la estabilidad de la aflatoxina  $M_1$  a lo largo del madurado y almacenamiento de queso Parmesano y Mozzarella 19 semanas a 7°C (43), y en el madurado y almacenamiento de Cheddar y de queso para fundir (41).

Otros autores han descrito esta misma estabilidad durante el madurado y almacenamiento 6 meses del queso Gouda (379) y el almacenamiento 2 semanas del queso Cottage (13). También en queso Blanco y Bakers tras el almacenamiento durante 2 meses en condiciones de refrigeración y congelación (401).

Fremy y Roiland (122) estudiaron en Camembert el efecto que el grado de contaminación por  $M_1$  pudiera tener sobre la

influencia que el madurado ejerce sobre dicha toxina. Llegaron a la conclusión de que la disminución en  $M_1$  durante el madurado parece tanto más fuerte conforme la contaminación es más débil.

Como hemos podido comprobar, en general los distintos autores coinciden en señalar la estabilidad de las aflatoxinas durante el madurado y almacenamiento del queso, con ligeras oscilaciones, que para unos autores suponen pérdidas de la aflatoxina que explican por: (i) difusión al medio; (ii) metabolización; Mientras que para otros significan aumento en la cantidad de aflatoxina, que explican por: (I) concentración de la masa seca del queso; (II) fenómenos proteolíticos que liberan parte de la aflatoxina ligada a la caseína, con lo que ésta es más fácilmente extraída y detectada.

#### I.1.d. Influencia de distintas formas de procesado de la leche sobre su contenido en aflatoxinas

Como tendremos ocasión de comprobar, la mayor parte de las experiencias realizadas, prácticamente todas, se han efectuado sobre la aflatoxina  $M_1$ .

I.1.d.1. Efecto del almacenamiento en refrigeración de la leche sobre la aflatoxina  $M_1$

En la literatura aparecen datos contradictorios sobre el efecto que la refrigeración de la leche podría tener sobre la aflatoxina  $M_1$  presente.

Una parte de los autores consideran evidente la reducción en  $M_1$  durante el almacenamiento de la leche, reducción que será mayor conforme se incrementa el periodo de conservación (92, 96). Esta afirmación se apoya en distintas experiencias realizadas hasta el momento.

Así, McKinney et al. (228) describieron la rápida desaparición de  $M_1$  en leche durante su almacenamiento a 0°C: después de 4, 6, 12 días se observó una destrucción del 40, 80 y 100% respectivamente.

Kiermeier y Mashaley (180) observaron a 5°C una reducción en  $M_1$  que variaba de 11-25%, comprobando que esto no dependía de si la contaminación se efectuaba de forma natural o artificial, o si la leche era cruda o pasteurizada; atribuyeron esta reducción a oxidaciones debidas al contacto de la toxina con el aire.

Contrariamente a estas experiencias, hay otra serie de autores que sostienen la estabilidad de las aflatoxinas durante el almacenamiento de la leche en refrigeración.

Stoloff et al. (350) no encontraron disminución en la  $M_1$  de la leche artificialmente contaminada con dicha aflatoxina en cloroformo, tras 17 días a 4°C, y tanto en leche cruda como pasteurizada.

Malin (213) en leche naturalmente contaminada no observó disminución de  $M_1$  al almacenarla a 4 y 10°C durante 24 y 48 h respectivamente.

Winterlin et al. (396) describieron la estabilidad de la aflatoxina  $M_1$  en leche tras 60 horas a 7°C.

Patterson et al. (260) durante el almacenamiento de leche 21 días a 4 °C con metabisulfito sódico, comprobaron que no disminuía la concentración de  $M_1$ .

Blanc et al. (32) no sólo comprobaron la no disminución de  $M_1$  tras 10 meses a 20°C en leche contaminada naturalmente, sino que sorprendentemente describieron un incremento superior al 50%

Con datos tan contradictorios, resulta difícil concluir qué es lo que ocurre realmente con las aflatoxinas que contaminan la leche cuando ésta es almacenada en condiciones de refrigeración. Debemos tener en cuenta que el almacenamiento en frío de la leche causa la disociación de la caseína, particularmente la  $\beta$ caseína, y su subsiguiente solubilización en el suero de leche (98); este cambio de la caseína podría



arrastrar la aflatoxina  $M_1$ , y dar resultados contradictorios según la técnica analítica utilizada.

#### I.1.d.2. Efecto de la congelación de la leche sobre la aflatoxina $M_1$

Pocas investigaciones se han llevado a cabo sobre el efecto que la congelación puede tener sobre las aflatoxinas presentes en leche.

McKinney et al. (228) describieron que a  $-18^{\circ}\text{C}$  se produce una pérdida en  $M_1$  del 14% a los 30 días y del 86% a los 120 días.

Stoloff et al. (350) indicaron la estabilidad de  $M_1$  en leche congelada tras 68 días; sin embargo, a los 100 y 120 días ya sí observaron una disminución significativa en su contenido, obteniendo reducciones entre el 25 y el 45% respectivamente. En las muestras en que se repitió la congelación después del muestreo la reducción fue todavía superior.

Kiermeier y Mashaley (180) describieron una pérdida del 30% de  $M_1$  tras 7 días de congelación en leche contaminada artificialmente; en leche naturalmente contaminada la pérdida fue bastante menor.

#### I.1.d.3. Efecto del tratamiento térmico de la leche

sobre la aflatoxina  $M_1$

La mayoría de los autores se muestran de acuerdo en afirmar que el tratamiento térmico de la leche (pasteurización y esterilización) no afecta, o lo hace de forma no significativa, a la aflatoxina  $M_1$  contenida en la leche (92, 112, 171, 300, 346, 351, 377, 397). Esta opinión se ha visto apoyada por los resultados obtenidos en distintas experiencias, como señalamos a continuación.

Allcroft y Carnaghan (7) encontraron que no disminuía la toxicidad de leche contaminada con  $M_1$  tras su tratamiento  $80^{\circ}\text{C}$ -45 sg,  $70^{\circ}\text{C}$ -30 min., utilizando como método de detección un test biológico en patitos. Esta técnica presenta el inconveniente de que la respuesta del conducto biliar a las aflatoxinas no es lo suficientemente sensible como para mostrar pequeños cambios en el contenido y toxicidad de la leche.

Polchofer (274) observó estabilidad térmica total de las aflatoxinas a  $92^{\circ}\text{C}$  durante 8 min.

Van Egmond et al. (379) no encontraron influencia del tratamiento térmico sobre la  $M_1$  en leche en las siguientes condiciones:  $72^{\circ}\text{C}$ -15 sg,  $90^{\circ}\text{C}$ -5 min.,  $140^{\circ}\text{C}$ -5 sg;  $140^{\circ}\text{C}$ -15 sg +  $110^{\circ}\text{C}$ -10 min.;  $95^{\circ}\text{C}$ -1 min.

Malin (213) no observó degradación de  $M_1$  a  $71^{\circ}\text{C}$ -40 sg.

Wiseman y Marth (403) no encontraron diferencias significativas entre leche contaminada natural y artificialmente, mostrando en ambas la  $M_1$  una gran estabilidad térmica a 64°C-2h, al igual que a 84 y 100°C.

Patel et al. (258) durante el proceso de elaboración del khoa, que precisa el calentamiento de la leche durante 3-4h para su concentración hasta obtener unos 186-225 g khoa por cada litro de leche, no encontraron apenas disminución en  $M_1$ .

Como ya hemos descrito en otros apartados de esta introducción, en estos estudios también se mantienen posturas contradictorias. Así, hay autores que mantienen que el tratamiento térmico de alguna forma altera el contenido en  $M_1$  de la leche (10, 96, 140, 284).

Los primeros en describir este hecho fueron Purchase et al. (284), que citan una reducción del 32% a 62°C-30 min., del 45% a 72°C-45 sg y del 81% por esterilización a 115°C. Estos estudios fueron efectuados utilizando una técnica analítica química y confirmados por análisis biológico en patitos.

Kiermeier y Mashaley (180) observaron mayores pérdidas en leche artificialmente contaminada que en la que lo estaba de un modo natural utilizando un tratamiento de HTST (71°C-40 sg): 28% y 6-13% respectivamente.

Las diferencias observadas entre los resultados descritos por los diversos autores en cuanto al efecto del tratamiento térmico sobre la aflatoxina  $M_1$  en leche podrían no obstante ser explicados si tenemos en cuenta los siguientes factores (363):

- \* Variabilidad de temperaturas aplicadas. En general, a mayor temperatura, mayor grado de reducción.
- \* Empleo de diferentes métodos analíticos.
- \* Utilización de leche natural o artificialmente contaminada.

Debemos tener en cuenta además que el tratamiento térmico puede influir en la recuperación de la toxina, por cuanto el calor puede alterar la solubilidad de las sales de la leche y la estructura de las proteínas (403).

#### I.1.d.4. Efecto del desnatado de la leche sobre la aflatoxina $M_1$

A este respecto, la totalidad de trabajos aparecidos en la literatura se muestran de acuerdo en afirmar que el contenido de  $M_1$  en nata es aproximadamente el mismo al de la leche original, y también aproximadamente igual al de la leche desnatada, en relación peso o volumen por supuesto. En cantidades totales, la distribución viene a ser aproximadamente 85% en leche descremada y 15% en nata (10, 96, 132, 180, 397).

I.1.d.5. Efecto del proceso de elaboración de la mantequilla sobre la aflatoxina  $M_1$

Durante este proceso la mayor parte de la aflatoxina  $M_1$  es eliminada con el suero de mantequería, en un grado variable descrito entre el 60-85%, permaneciendo el resto en la mantequilla (10, 11, 132, 351, 400). Sin embargo, Malin (213) obtuvo valores distintos: 10-17% en suero, 60-84% en mantequilla.

También se ha descrito la estabilidad de  $M_1$  en estos productos durante al menos 4 días.

I.1.d.6. Efecto del procesado del queso fundido sobre las aflatoxinas

Se han realizado distintas experiencias describiendo la estabilidad de las aflatoxinas durante este proceso, tanto de  $M_1$  (41, 274) como de  $B_1$  y  $G_1$  (183). En este último estudio se emplearon temperaturas variables de 70 a 140°C durante 10 minutos con los siguientes resultados: hasta 100°C no hubo apenas destrucción de las toxinas; a 120°C se apreció una reducción del 8%, y a 140°C del 10%, circunstancia que confirmaría la estabilidad térmica de las aflatoxinas.

I.1.d.7. Efecto de la elaboración de leche concentrada sobre la aflatoxina M<sub>1</sub>

Si bien hay autores que consideran que el proceso de concentración de la leche no produce pérdidas en su contenido en aflatoxina M<sub>1</sub> (171, 300), la mayor parte opinan que se produce una pérdida entre un 60-75% (99, 237, 281).

Malin (213) describió pérdidas inferiores, que pormenoriza en un 5-6% por el precalentamiento, 15% por la elevada temperatura y otro 15% durante el proceso de deshidratación propiamente dicho.

Para Wiseman y Marth (400) la disminución observada por diversos autores en el contenido en M<sub>1</sub> en la leche desecada podría ser explicada por una dificultad en la recuperación de dicha toxina.

I.1.d.8. Efecto de la elaboración de yogur sobre las aflatoxinas

La mayor parte de los autores sostienen la nula influencia que el proceso de elaboración del yogur tiene sobre la

aflatoxina  $M_1$  (346, 351, 377). Esto ha sido comprobado en distintas experiencias.

Van Egmond et al. (379) emplearon leche contaminada naturalmente, y observaron un ligero enriquecimiento en  $M_1$  del yogur en relación con la leche de partida; asimismo, describieron la estabilidad de la toxina durante el almacenamiento al menos 7 días a 7°C. Este incremento en la recuperación de  $M_1$  en yogur en relación a la leche inicial es posiblemente debido a errores imputables a la técnica de recuperación y cuantificación.

Wiseman y Marth (399) no describieron este incremento de recuperación, sino que indicaron que la  $M_1$  permanece completamente estable cuando el yogur es elaborado a partir de leche naturalmente contaminada. Dentro de estas mismas experiencias, elaboraron kefir, al final de cuyo proceso de elaboración se aprecia una aparente reducción en el contenido en  $M_1$  por unidad de producto.

Fremy y Chu (119), también en yogur elaborado a partir de leche naturalmente contaminada, observaron valores similares a los de la leche inicial.

Sin embargo, las investigaciones realizadas por Megalla y Hafez (231), estudiando la influencia que el proceso de elaboración del yogur tiene sobre la aflatoxina  $B_1$ , llevaron a la descripción de una clara disminución de la toxina, que

indican es debida a la transformación de  $B_1$  en  $B_{2a}$ , por medio de un proceso químico no enzimático (concretamente por el ácido presente en el yogur). Estos resultados fueron comprobados por análisis químico y confirmados mediante pruebas biológicas en pollos.

#### I.1.d.9. Efecto de la elaboración de productos lácteos congelados sobre la aflatoxina $M_1$

Wiseman y Marth (402) estudiaron la estabilidad de  $M_1$  durante la elaboración de helado y granizado a partir de leche naturalmente contaminada.

En el caso del helado, el contenido en  $M_1$  permaneció constante después de la congelación y durante 8 meses de almacenamiento.

En cuanto al granizado, el contenido en  $M_1$  pareció inexplicablemente incrementarse durante su elaboración: el producto final contenía aproximadamente el mismo nivel de  $M_1$  que la leche usada en su preparación, pero ésta suponía únicamente el 26% de la mezcla total del granizado. Durante su almacenamiento se apreciaron oscilaciones en la  $M_1$  recuperada, que más bien deberían ser atribuidas a la técnica analítica utilizada.



## I.2. CONTAMINACION DIRECTA DE LOS PRODUCTOS LACTEOS POR AFLATOXINAS

### I.2.a. Aislamiento de hongos aflatoxicogénicos de productos lácteos

#### I.2.a.1. Queso

El queso es el producto lácteo en que se ha llevado a cabo un estudio más profundo de su flora fúngica, por múltiples razones entre las que podemos citar:

- En muchas ocasiones los mohos intervienen en su proceso de maduración, y por tanto es interesante conocer este tipo de población.

- Asimismo es el derivado lácteo que más fácilmente se enmohece ya que al ser un substrato rico en componentes nutritivos, expuesto a la atmósfera y que madura y se conserva a temperaturas y humedades adecuadas para el crecimiento fúngico, no es raro observar en las cavas de maduración de la mayoría de los tipos de quesos abundante crecimiento fúngico sobre ellos.

El enmohecimiento de los quesos por una parte constituye un verdadero problema para los industriales del sector por afectar al aspecto y palatabilidad de los mismos. Y por otra

también preocupa a las autoridades sanitarias, toda vez que parte de la flora que se desarrolla sobre los quesos puede ser micotoxicogénica.

Normalmente, por las temperaturas a las que se produce la maduración del queso, la flora fúngica predominante suele ser del género Penicillium (157). Ahora bien, debe tenerse en cuenta que la ausencia de hongos toxicogénicos no garantiza que el producto se encuentre libre de micotoxinas, toda vez que éstas pueden persistir largo tiempo después de que los hongos hayan desaparecido (53).

A continuación haremos una revisión de los distintos trabajos aparecidos en la literatura sobre determinación de flora fúngica en queso.

Bullerman y Olivigni (58), a partir de queso Cheddar, aislaron un total de 349 cepas, de las que 287 fueron Penicillium y 23 Aspergillus. De estos 23, 11 produjeron sustancias tóxicas para embrión de pollo, y 5 para Bacillus megaterium, aunque sólo en 1 se comprobó químicamente que tenía capacidad para sintetizar aflatoxinas.

Bullerman (50) llevó a cabo la determinación de la flora fúngica de queso Swiss. Aisló 183 cepas de las que el 87% se encontraban incluidas en el Género Penicillium, y únicamente 1 cepa fue identificada como A.flavus, teniendo la capacidad de producir aflatoxinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>.

Bullerman nuevamente (51) aisló 327 cepas de hongos de quesos enmohecidos durante el proceso de maduración, de las que ninguna estaba clasificada como Aspergillus .

Gaddi (citado en 217) aisló 144 cepas de hongos de 14 variedades de queso en Estados Unidos, de los que 69% fueron Penicillium y 9% Aspergillus .

Bullerman (49, 54) investigó 78 muestras de quesos estadounidenses y 75 de quesos importados. En los quesos nacionales llegó a aislar 256 cepas fúngicas, de las que el 86% eran Penicillium y 2.3% Aspergillus ; de estas últimas, 2 cepas resultaron capaces de producir aflatoxinas. En quesos importados aisló 479 cepas, un 80% de Penicillium y un 5.4% de Aspergillus , de los que 11 fueron A.flavus , todos ellos capaces de producir aflatoxinas. Cuando dejó que sobre el propio queso sin inocular se desarrollasen los hongos, únicamente crecieron cepas de Penicillium .

Torrey y Marth (365) analizaron 30 muestras de queso aislando 25 cepas de mohos, de las que 21 fueron Penicillium y 2 Aspergillus , ambos con capacidad aflatoxicogénica.

Northolt et al. (249) aislaron hongos de quesos visiblemente enmohecidos, en porcentajes similares a los anteriormente citados: 86.5% de Penicillium y 7.6% de Aspergillus .

Asimismo, Jarvis (157) aisló Penicillium del 84% de las muestras y un total de 3 cepas de Aspergillus.

Moubasher et al. (242), de 6 quesos Roquefort, no consiguieron aislar A.flavus, probablemente debido a que este hongo es inhibido por el Penicillium roqueforti, que resultó lógicamente presente en todas las muestras.

Verdyan (384) describió el proceso de contaminación y crecimiento de forma natural de una cepa de A.flavus en un queso almacenado en un domicilio. Una vez aislada la cepa pudo comprobarse su aflatoxicogenicidad.

El-Essawy et al. (100) consiguieron aislar Aspergillus de queso Roumy, sin especificar más datos acerca de su posible capacidad tóxica.

Calvo et al. (68) llevaron a cabo en 1979 un estudio de diferentes quesos españoles. Tras investigar 50 muestras, concluyeron que el 52% de las mismas se encontraba contaminado con A.flavus, y en un porcentaje ligeramente superior, 62%, por Penicillium. De 10 de las cepas de A.flavus aisladas, 5 inhibían el crecimiento de Bacillus megaterium y 3 resultaron tóxicas para Artemia salina. El porcentaje de muestras contaminadas con A.flavus, como puede comprobarse, es muy superior al indicado en otros países por los diferentes autores.

Como resumen de estos estudios se puede concluir que la incidencia en quesos de hongos capaces de producir micotoxinas conocidas es muy baja, y esos hongos constituyen una mínima parte de la flora fúngica total (50).

Finalmente indicar que en Europa se están incrementando los porcentajes de cepas aflatoxicogénicas detectadas como consecuencia de su introducción, junto con distintos productos agrícolas, procedentes de países tropicales y subtropicales (158).

#### 1.2.a.2. Yogur

Spillman y Geiges (343) analizaron 31 muestras de yogur, 25 de frutas y 6 naturales, con el sorprendente resultado de no conseguir el aislamiento de hongos de los géneros Penicillium ni Aspergillus, cuando el Género Penicillium ha sido descrito como más abundante en los productos lácteos, como han mostrado distintos autores y se puede comprobar en esta revisión.

En estudios efectuados en nuestro laboratorio (222) se investigaron 473 muestras de yogur, aislando Aspergillus de un 4% de las mismas, si bien el género predominante resultó ser el Penicillium. Se aislaron 5 cepas aflatoxicogénicas, todas ellas pertenecientes a la especie A.flavus.

### 1.2.a.3. Otros productos lácteos

Existen diversas descripciones sobre aislamientos esporádicos de Aspergillus a partir de distintos productos lácteos. Así, podemos citar las siguientes experiencias:

- Cooke y Braxis (78) aislaron 5 cepas de A.flavus a partir de leche cruda y helados en Estados Unidos.

- Jesenska y Polakova (159) obtuvieron a partir de leche en polvo un total de 11119 cepas pertenecientes a 29 géneros, de las que 116 se clasificaron como A.flavus. En este trabajo el autor no cita porcentaje de cepas tóxicas.

- Jesenska et al. (160), de 25 muestras de leche en polvo aislaron 1 cepa aflatoxicogénica de A.flavus.

- Moreau (237), también en leche en polvo, de 30 muestras, detectó A.flavus en un 23% de las mismas.

- Y finalmente, Sutic et al. (360), que en 223 muestras de leche y productos lácteos aislaron 221 cepas de mohos. De ellas, el 59.13% pertenecientes al Género Penicillium, y el 3.16% al Aspergillus. De 7 cepas de Aspergillus aisladas, 2 se clasificaron como A.flavus, ambas capaces de sintetizar aflatoxina B<sub>1</sub>.

#### 1.2.b. Estudio de la producción de aflatoxinas en productos lácteos

La leche y los productos lácteos son excelentes medios de cultivo para A.flavus (150). En principio, debemos tener en cuenta que se trata de sustratos con un elevado contenido en nutrientes y una humedad adecuada para el crecimiento de este hongo, así como para la producción de aflatoxinas (394).

##### 1.2.b.1. Queso

Hace años el crecimiento fúngico sobre el queso era considerado como un factor no deseado por razones estéticas y porque podía dar lugar a sabores extraños. Cuando se comenzó a describir que alguna de las cepas contaminantes podía tener capacidad micotoxicogénica, se incorporó un importante factor de riesgo sanitario para el consumidor. El hecho de que los Aspergillus, y concretamente A.flavus y A.parasiticus, sean ubicuos en la naturaleza y por tanto muy elevadas las posibilidades de contaminar los alimentos, hace necesaria la consideración y estudio sobre la posibilidad de formación de aflatoxinas en queso, aun cuando no todas las cepas de estos hongos sean aflatoxicogénicas.

Ha sido descrito por diversos autores que el queso constituye un buen sustrato para el desarrollo de Aspergillus por su

constitución nutritiva (174, 179, 232, 363). Por el contrario, otros autores opinan que debido a la carencia de una buena fuente de carbono, el queso no constituiría un buen sustrato para estos hongos (11, 55, 104, 408). Dada la gran diversidad de quesos existentes en los diversos países del mundo, ambas posturas pueden ser correctas y tener su parte de razón.

La contaminación con esporas toxicogénicas se puede producir a todo lo largo del proceso de elaboración del queso (363), aunque es en la última fase, durante el madurado y almacenamiento, cuando es más común que tenga lugar (58, 173, 242, 255).

Para prevenir el desarrollo de hongos durante el madurado de los quesos se toman una serie de medidas por parte de las Industrias Queseras (364):

- a) Lavado regular de la superficie del queso.
- b) Cubrimiento del queso con una bolsa de plástico o una capa de parafina, con el fin de producir condiciones anóxicas en su superficie.
- c) Tratamiento de la superficie del queso con sustancias antifúngicas como puede ser la pimaricina (procedimiento no admitido en algunos países, incluido España).

Dos cuestiones deben tenerse en cuenta a la hora de los estudios sobre la producción de aflatoxinas en queso:



(i) Posibilidad de difusión de las aflatoxinas hacia el interior a partir de la corteza, que es el lugar donde normalmente son producidas.

(ii) Cambios que sufre el queso durante la maduración, que pueden afectar tanto el crecimiento del hongo como a la metabolización de las aflatoxinas ya formadas.

Los trabajos de investigación sobre la producción experimental de aflatoxinas en queso comenzaron en 1967 con Lie y Marth (198), quienes inocularon la superficie cortada de un queso Cheddar con una suspensión de esporas, tanto de A.flavus por una parte como de A.parasiticus por otra; incubaron a temperatura ambiente con un elevado porcentaje de humedad, durante 1 y 7 semanas. Estos autores describieron una producción máxima de aflatoxinas de 31.2 µg/g en la capa superficial; estos compuestos tóxicos además se difundieron hasta una segunda capa de 0.64 cm, en la que detectaron 0.624 µg/g; asimismo, efectuaron la extracción separada del micelio, y detectaron en el 70 µg/g.

Estos autores comentan que con estos resultados, el consumo de 0.1 g del queso inoculado con A.parasiticus y 3 g del inoculado con A.flavus supondría la ingestión de 10 µg de la toxina, dosis que consumida diariamente durante breves periodos de tiempo puede inducir la formación de tumores hepáticos. De la segunda capa, sería necesario un consumo entre 16 y 40 g.

Wildman et al. (394), también en 1967, en un estudio

realizado acerca de la producción de aflatoxinas sobre varios sustratos, incluyeron entre éstos al queso sin esterilizar (sin especificar tipo). Obtuvieron un nivel de producción muy inferior al descrito en el trabajo anterior, sólo 0.05 µg/g.

Lie y Marth (199) llevaron a cabo un nuevo estudio, esta vez sobre queso Cottage, al que ajustaron a distintos pHs con objeto de apreciar la influencia de este factor en la producción de aflatoxinas. En este caso, la cantidad que llegaron a detectar, en el caso más favorable, resultó ser muy inferior a la que ellos mismos habían descrito en queso Cheddar (198).

Frank (113) demostró la producción de aflatoxinas en porciones de queso Tilsit inoculadas con una suspensión de esporas de A.flavus. Para ello incubó a una temperatura de 30°C, que sin embargo está muy alejada de la normal de madurado de este queso (alrededor de los 16°C). En estas experiencias obtuvo un nivel máximo de producción de 0.8 µg/g, detectando aflatoxinas a 5 mm de la superficie.

Este mismo tipo de queso, junto con el Emmental fueron los utilizados en sus investigaciones por Rothenbuhler y Bachmann (299). Al incubarlos a 20 y 30°C, encontraron una producción de aflatoxinas inferior a la descrita en el caso anterior (0.4 µg/g). Estos mismos autores no llegaron a detectar aflatoxinas en 24 tipos distintos de queso a los que se expuso entre 2 y 4 meses a crecimiento fúngico espontáneo e

incontrolado.

Mihai et al. (232) describieron la producción de considerables cantidades de aflatoxinas en quesos Rumanos.

Kiermeier y Groll (179) también llevaron a cabo estudios sobre porciones de queso Tilsit, encontrando producción de aflatoxinas a 16°C por A.flavus (temperatura de madurado de este queso), llegando éstas a una profundización de 6-12 mm. Describieron asimismo la producción de aflatoxinas a 5 y 10°C por una cepa de Penicillium puberulum. En cambio, no consiguieron dicha producción en otros tipos de queso (Camembert y Romadur) lo que justifican por el crecimiento de otros hongos que constituyen el fermento fúngico utilizado en su maduración, que evitarían el desarrollo de las cepas toxicogénicas.

Kiermeier y Eyrich (citado en 319) no consiguieron producir aflatoxinas sobre distintos tipos de queso: queso de Oveja, Geheimrat y queso para fundir empaquetado.

Bajos niveles de producción sobre queso Cheddar fueron descritos por Oldham et al. (250) a pesar de utilizar una elevada temperatura de incubación (25 °C). En este mismo estudio, se sometieron 32 muestras de queso no inoculado a la misma temperatura y condiciones, y todas ellas fueron negativas a crecimiento micelial y producción de aflatoxinas.

Shih y Marth (330) en queso Brick inoculado experimentalmente demostraron la producción de aflatoxinas a una temperatura de sólo 12.8°C, llegando a detectar estas toxinas en la capa situada a 30-40 mm de la superficie, que es el máximo de difusión citado en la literatura para los distintos tipos de queso.

Kiermeier y Rumpf (183) demostraron la producción de aflatoxinas en quesos Tilsit y Emmental a 25°C con un 98% de humedad relativa.

Burzynska (63) inoculó Cottage con una suspensión de esporas de A.flavus, describiendo una producción a 25°C de 0.4 µg/g de aflatoxina B<sub>1</sub>.

Lieu y Bullerman (200) demostraron la producción de aflatoxinas en quesos Swiss y Mozzarella inoculados con A.flavus, tras 14 días a 25°C, aunque en niveles muy bajos: 0.05 µg/g de B<sub>1</sub>.

Kiermeier y Behringer (175) describieron la producción de aflatoxinas en quesos Provolone y Tilsit inoculados por intensa vaporización con una suspensión de esporas, consiguiendo la producción a 14 y 20°C, aunque en pequeña cantidad: 0.054 µg/g. Describieron una profundización de las toxinas de 10 a 20 mm.

Estos mismos autores (174) describieron producción de

aflatoxinas sobre porciones de queso Tilsit incubadas a 5°C durante 21 días en un nivel de 0.121 µg/g. Dentro de estos mismos estudios, demostraron la producción de estas toxinas en queso Camembert, sin especificar la metodología seguida, fundamentalmente en cuanto a si se trataba de queso entero o de porciones, factor muy importante en este tipo de quesos elaborados con fermentos fúngicos.

Polzhofer (275) describió producción de aflatoxinas en queso para fundir (originalmente Emmental) mantenido a 25°C y 90% de humedad relativa.

Engel (104) utilizó porciones de queso Tilsit previamente esterilizado, demostrando síntesis de aflatoxinas sobre el mismo a 16 y 27°C.

Park y Bullerman (255) señalaron la producción de aflatoxinas a 15 y 25 °C en Cottage, queso para fundir y porciones de Cheddar. Las toxinas difundieron hasta una segunda capa de 10 mm.

Estos mismos autores (256) describieron producción en Cheddar a 15, 18 y 25°C, y a temperaturas cíclicas de 5 y 25°C.

Karaioannoglou (167) indicó la producción de aflatoxinas en porciones de queso Feta a 13 y 26°C. Señaló la aparición de una pigmentación amarillenta que difundía 1-2 cm hacia el interior del queso. Observó profundización de las toxinas

hasta 16-24 mm.

Zerfiridis (408) realizó estudios sobre queso Teleme, una variedad de queso blando que se mantiene en salmuera durante su madurado y almacenamiento en refrigeración. Describió producción de aflatoxinas a 16 y 25°C en 3 y 7 semanas, con profundización hasta una segunda capa de 10 mm.

Todas estas experiencias pueden resumirse en las apreciaciones de Jacquet y Tantaoui-Elaraki (153), quienes en un amplio estudio realizado sobre la posibilidad de crecimiento de hongos aflatoxicogénicos y consiguiente producción de aflatoxinas sobre diferentes tipos de queso, obtuvieron unos resultados a partir de los cuales establecieron 3 categorías distintas de queso:

(a) Aquéllos en los cuales se pudo demostrar la producción de aflatoxinas: Boursin, Bonbel, Gouda, Pyrénées, Emmental, Vache qui rit y ciertos quesos cuando son desprovistos de su corteza: Camembert, Coulommiers, Queso de Cabra, Pont l'Eveque.

(b) Aquéllos en los que hubo crecimiento pero no producción de aflatoxinas: Boursin au Poivre, Munster y Reblochon sin corteza, Edam, Mimolette.

(c) Aquéllos que no soportaron crecimiento ni consecuentemente producción de aflatoxinas: Camembert, Coulommiers, Brie, Queso de Cabra, Pont l'Eveque, Munster, Maroilles, Reblochon, Bleu d'Auvergne, Roquefort.

Como resumen de todos estos resultados establecieron:

(i) los quesos frescos y fundidos son muy favorables al crecimiento de A.flavus .

(ii) Los quesos de pasta firme son simplemente favorables.

(iii) Los quesos de pasta verde son totalmente desfavorables.

En resumen, y a la vista de todas estas experiencias podría afirmarse que, en general, respecto al peligro existente en cuanto a la producción de aflatoxinas sobre el queso, pueden excluirse aquellos tipos de queso que están poco tiempo en el mercado y/o los que llevan incorporados cultivos iniciadores fúngicos. Por otra parte, serían adecuados aquellos tipos de queso que necesitan un prolongado tiempo de maduración, a humedades relativas elevadas y los que normalmente presentan un abundante crecimiento fúngico espontáneo. Aun en estos casos, si el queso es conservado durante el madurado en condiciones adecuadas de temperatura y humedad, y posteriormente almacenado a temperaturas de refrigeración, se evita en gran medida el peligro de producción de aflatoxinas (58, 170, 198).

Con respecto a la producción de aflatoxinas en queso, además del factor hasta ahora considerado (tipo de queso), influyen otros condicionantes que a veces llegan a ser determinantes, y que estudiaremos posteriormente con detenimiento, como son: temperatura, humedad, pH, crecimiento competitivo, papel

defensivo de la corteza, atmósfera, cepa contaminante, etc.

#### 1.2.b.2. Yogur

En la bibliografía consultada únicamente hemos encontrado descrita la producción de aflatoxinas sobre yogur por Park y Bullerman (255). Estos autores transfirieron 25 g de yogur de contenedores comerciales a contenedores estériles de 7 cm de altura; los inocularon con una suspensión de esporas, tanto de A.flavus como de A.parasiticus, obteniendo los siguientes resultados:

Con A.parasiticus a 15°C sólo se detectó producción a los 21 días, en un nivel de 0.9 µg/g; y a 25°C, 1.3 µg/g en 10 días y 1.2 µg/g en 21 días.

Con A.flavus se produjeron cantidades de aflatoxinas muy superiores a las descritas para A.parasiticus. A 15°C produjo 2.6 µg/g en 10 días y 158 µg/g a los 21 días. A 25°C la producción fue de 101 µg/g en 10 días y 138 µg/g en 21.

A 5°C únicamente se detectaron cantidades traza, que posiblemente fueran las incorporadas por las esporas del inóculo, ya que debemos tener en cuenta que 10<sup>6</sup> conidios de A.flavus o A.parasiticus contienen de 10 a 2000 ppb de B<sub>1</sub>, dependiendo de la cepa, edad y sustratos utilizados para la producción de las esporas (142).



#### 1.2.b.3. Otros productos lácteos

Como hemos indicado al comienzo del presente capítulo, la leche y productos lácteos constituyen un buen sustrato para la producción de aflatoxinas. Tanto es así que diversos autores han utilizado la leche como medio de producción de estas toxinas, e incluso para la detección de cepas aflatoxicogénicas.

Así, Bassir y Addekunle (24) utilizaron leche fresca de vaca, cuya única fuente de glúcidos es la lactosa, como medio de producción de aflatoxinas, consiguiendo niveles de 9.5 µg/g de aflatoxina B<sub>1</sub>, con un peso de micelio seco de 1.4g por cada 100g de sustrato.

Jacquet y Tantaoui-Elaraki en distintos trabajos (154, 362) utilizaron leche entera homogeneizada y esterilizada como medio de cultivo para detección de cepas toxicogénicas.

Kandem y Percefois (166) utilizaron leche con esta misma finalidad, encontrando niveles de producción de aflatoxinas superiores incluso a los hallados en medio Czapeck.

A pesar de estos estudios, el uso de la leche como medio de cultivo para detección de cepas aflatoxicogénicas no ha podido ser generalizado debido a que presenta un grave

inconveniente como es la difícil extracción de las aflatoxinas de la misma (166).

Otros productos lácteos sobre los que se ha estudiado la producción de aflatoxinas han sido:

- \* Crema de leche, donde se han conseguido niveles de producción de 2.6 mg de aflatoxina B<sub>1</sub> tras 9 días a 30°C (150, 363).

- \* Leche en polvo, que bien conservada no permite ningún tipo de crecimiento fúngico, pero que si se humedece se puede transformar en un buen sustrato para producción de aflatoxinas (153). Kiermeier y Behringer (174) han descrito la producción de aflatoxinas sobre este sustrato incluso a 1 y 5 °C, en experiencias que no han sido confirmadas por otros autores.

- \* La mantequilla, por su elevado contenido en lípidos y escaso en proteínas y glúcidos, apenas permite el crecimiento de Aspergillus sobre ella (153). En caso de que éste se produzca, solamente se detectan bajos niveles de aflatoxinas: 0.5 µg/g (292).

- \* Sobre la leche concentrada azucarada no se ha conseguido el crecimiento de Aspergillus, quizás debido a su elevado contenido en sacarosa (153).

- 58 -

\* El lactosuero permite el crecimiento de cepas aflatoxicogénicas, pero no la producción de aflatoxinas (153, 363).

I.2.c. Factores que influyen en la producción de aflatoxinas  
en productos lácteos

I.2.c.1. Temperatura

La temperatura óptima de producción de aflatoxinas se encuentra íntimamente correlacionada con otros factores, fundamentalmente con la composición del substrato sobre el que se desarrolla el hongo. Debe tenerse en cuenta que la temperatura óptima de producción de estas toxinas no tiene por qué coincidir exactamente con la óptima de crecimiento del hongo (319).

Se ha descrito que la temperatura óptima de producción de aflatoxinas para prácticamente la totalidad de los substratos investigados se encuentra comprendida entre 25 y 30°C (3, 56, 59, 87, 165, 179, 219, 245, 295, 319, 320, 336, 366).

Determinados autores han llegado a establecer diferencias entre la temperatura óptima de producción de cada una de las aflatoxinas. Así, para Rabie y Smalley (citado en 129) la temperatura óptima para producción de aflatoxina B<sub>1</sub> sería 24°C

mientras que para G<sub>1</sub> sería 30°C. No obstante, la mayoría de los autores coinciden en señalar que la aflatoxina B predominaría a altas temperaturas, mientras que las G serían producidas en mayores cantidades a temperaturas más bajas (72, 93, 203, 256, 320).

La temperatura mínima para la producción de aflatoxinas estaría comprendida entre 10 y 13°C, y la de crecimiento del hongo entre 6 y 8°C, dependiendo del substrato (55, 56, 57, 94, 129, 145, 167, 174, 299, 319, 381). Schindler (318) consiguió producción sobre medio sintético a 7.5 °C, y Northolt et al. (248) a 10°C sobre Agar extracto de Malta. A pesar de estas experiencias debe tenerse en cuenta que aunque A.flavus es capaz en condiciones de laboratorio de producir aflatoxinas a 13 ° C, en condiciones naturales a esta temperatura su desarrollo sería inhibido por otros hongos, principalmente pertenecientes al Género Penicillium (366).

La temperatura máxima a que se ha conseguido la producción de estas toxinas ha sido descrita por distintos autores entre 40 y 45°C (94, 145, 335, Rabie y Smalley citado en 245).

Ahora bien, la temperatura tanto mínima como máxima de producción de aflatoxinas está condicionada por la interacción de otros factores, como son la humedad, concentración de oxígeno, nutrientes y cepa de que se trate (129, 256).

El efecto que la composición del substrato tiene sobre la producción de aflatoxinas es menor a altas temperaturas (320).

En cuanto a la humedad, tiene un efecto positivo sobre el crecimiento del hongo y la síntesis de aflatoxinas: así, cuanto más elevada es, más baja es la temperatura requerida

(59).

Por otra parte, las temperaturas elevadas (33°C) favorecen el que se acumule un mayor porcentaje de aflatoxinas en el micelio (203). Por contra, Shih y Marth (333) afirman que con el incremento de la temperatura, aumenta la difusión y secreción de aflatoxinas al medio.

Las temperaturas cíclicas reducen notablemente el tiempo de esporulación y síntesis de aflatoxinas (358), si bien Park y Bullerman (256) comprobaron la menor producción de aflatoxinas a temperaturas cíclicas que a 25, 18 y 15°C por *A.flavus* ; cuando se inoculaba *A.parasiticus* , la producción resultó ser mayor a temperatura cíclica.

A este respecto, cortos periodos de alta temperatura tienen mucho mayor efecto en la producción de aflatoxinas que cortos periodos de baja temperatura (321). Por contra, para Lin et al. (203) no hay diferencia significativa en las aflatoxinas producidas entre ciclos de temperatura baja o alta.

Finalmente indicar que cuando el crecimiento de *A.flavus* y consiguiente producción de aflatoxinas se produce a bajas temperaturas, no suele acompañarse de esporulación, lo que resulta en un mayor riesgo para el consumidor, por no hacerse distinguishable de otros hongos no micotoxicogénicos (256, 381).

#### 1.2.c.2. Humedad (actividad de agua)

Para Austwick y Ayerst, éste es el factor más importante en el crecimiento y producción de aflatoxinas por A. flavus (18). En general, se puede decir que dentro de ciertos límites un incremento de la humedad daría lugar a un más rápido crecimiento y consiguientemente a una mayor producción de aflatoxinas (245).

El mínimo de producción de aflatoxinas se sitúa aproximadamente en una aw de 0.83 a 0.88, dependiendo fundamentalmente de otros dos factores muy importantes: la temperatura y el sustrato (87, 95, 129, 179, 188, 233, 248, 294, Hunter citado en 145).

#### 1.2.c.3. pH

En la bibliografía consultada se citan distintos valores de pH como óptimos para la producción de aflatoxinas.

Lie y Marth (199) estudiaron la influencia del pH sobre la producción de aflatoxinas en queso Cottage situado a distintos valores de pH. Cuando utilizaban ácidos o álcalis inorgánicos para ajustar dicho pH, A. flavus fue capaz de iniciar su crecimiento en un rango de pH de 1.7 a 9.14,

siendo óptimo entre 3.42 y 5.47. En cambio, cuando utilizaban ácido láctico o hidróxido amónico, el crecimiento únicamente se producía en valores de pH de 3.13 a 5.90, aunque no es aventurado suponer que la inhibición en este segundo caso no sólo se debió al factor pH.

Agnihotri (3) observó un pobre crecimiento de A. flavus a pH demasiado ácidos (2 - 4) o demasiado alcalinos (10 - 12), afirmando que en general los medios alcalinos no son adecuados para la producción de aflatoxinas.

Para Buchanan y Ayres (47) si bien el máximo crecimiento fúngico se produce a un pH inicial de 5, la máxima producción de aflatoxinas por unidad de crecimiento se produce entre 6 y 7. Estos valores se muestran de acuerdo con los de Reddy et al. (291).

Otros valores descritos como óptimos por distintos autores han sido 4.5 (363), 6.5 (56), 4 (165), entre 4 y 6 (219), entre 5 y 6 (295).

Para Davis et al. (88) el pH inicial del medio, siempre que se encuentre dentro de ciertos límites, no ejerce una influencia significativa tanto sobre la producción de aflatoxinas como sobre el crecimiento. Esto también fue indicado por Holmquist et al. (145).

Se ha descrito también que el efecto del pH está íntimamente



relacionado con la composición del medio, por lo que el pH inicial para la producción óptima de aflatoxinas debería ser determinado para cada tipo de substrato (47, 48).

Como en el caso de la temperatura, se han descrito diferencias en cuanto al pH óptimo de producción de las distintas aflatoxinas: así Buchanan y Ayres (48) observaron que a pH inferior a 6 se veía favorecida la producción de aflatoxina B, mientras que a pH superior a 6 sería la producción de G la favorecida. Un pH inicial de 3 pareció estimular la producción de B<sub>2</sub> y G<sub>2</sub>, mientras que valores iniciales de 7 y 8 deprimían la producción de B<sub>2</sub>. Este fenómeno podría estar relacionado con la disminución en B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub> por su conversión a B<sub>2a</sub> y G<sub>2a</sub> debido a la acidez del medio, incrementándose por tanto los valores relativos de B<sub>2</sub> y G<sub>2</sub>.

Para la mayoría de los substratos el pH no tendría demasiada importancia, toda vez que una vez iniciado el crecimiento del hongo se origina una modificación del mismo, en la mayoría de los casos hacia la neutralidad, aunque ésto logicamente dependerá mucho de la composición del medio y de los metabolitos producidos por la cepa de que se trate (199). Por contra, Davis et al. (88) indicaron que el pH final se aproximaría a 4, y para Mateles y Adye (221) llegaría a 2.1-2.3.

#### I.2.c.4. Factores nutritivos del medio

La mayoría de los autores coinciden en señalar que la producción de aflatoxinas es más abundante en substratos con elevados niveles de carbohidratos, inhibiéndose por otra parte parcial o totalmente la producción de uno o más enzimas necesarios para la síntesis de aflatoxinas cuando se cultiva *A. parasiticus* en un medio conteniendo solamente peptona y sales minerales; al transferir este cultivo a un medio con glucosa, la producción de aflatoxinas se normalizó (1). Por tanto, la glucosa parece jugar un papel importante en la inducción de la vía enzimática responsable de la biosíntesis de estas micotoxinas (2).

De todos modos y a pesar del indudable papel de los carbohidratos en la síntesis de aflatoxinas (335), se ha comprobado que un insuficiente aporte en Nitrógeno o algunas sales minerales puede producir un efecto negativo en la síntesis de estas toxinas (394).

En cuanto al tipo de fuente hidrocarbonada, si bien determinados autores han indicado la muy baja o nula producción de aflatoxinas cuando se utiliza la lactosa como única fuente de Carbono (1, 55, 331), Bassir y Adekunle (24) consiguieron una abundante producción de B<sub>1</sub> utilizando la lactosa como única fuente de Carbono.

#### 1.2.c.5. Atmósfera

En líneas generales la mayoría de los autores se muestran de acuerdo en señalar que A.flavus y A.parasiticus son hongos aerobios, con una fuerte dependencia en cuanto al oxígeno se refiere, con lo que una baja concentración de  $O_2$  y/o alta concentración de otros gases puede deprimir el crecimiento fúngico y la formación de aflatoxinas (59, 129). Así, Sanders (311) describió que altos niveles de  $CO_2$  (20-40%) unido a una baja humedad relativa (86%), prevenían la producción de aflatoxinas en cacahuete. Para Landers et al. (195) un 20% de  $CO_2$  en la atmósfera deprime marcadamente la producción de aflatoxinas.

En general pues, puede decirse que incrementando la concentración de  $CO_2$ , disminuirá la producción de aflatoxinas (332).

A pesar de todo lo apuntado, ciertos autores han descrito que A.flavus es capaz de madurar en 3 días en anaerobiosis (75), y que condiciones prácticamente de anaerobiosis favorecerían la síntesis de aflatoxinas. Para Shih y Marth (335) esto podría ayudar a explicar por qué el máximo nivel de aflatoxinas aparece en un medio con una alta concentración de glucosa, toda vez que en estas condiciones el hongo probablemente desarrollaría un modo menos aeróbico de metabolismo en respuesta al exceso de glucosa.

Buena prueba de estas posturas contradictorias es la controversia existente sobre si el mantenimiento de un cultivo de cepas aflatoxicogénicas en agitación (lo que

produciría una mayor aireación) favorece o no la producción de aflatoxinas. Esto parece dependiente del medio de cultivo utilizado, debido a las contradicciones entre trabajos de distintos autores. Unos indican que el cultivo en agitación favorece dicha producción (138, 142), mientras que para otros es equiparable (219) y para algunos otros se producen niveles inferiores (334, 336).

#### I.2.c.6. Luz

La influencia negativa que sobre la producción de aflatoxinas tiene la luz ha sido descrita por varios autores. Así, Joffe y Lisker (165) consiguieron la producción de 5 veces más aflatoxinas en ausencia de luz.

Otros autores, sin embargo, no han comprobado este efecto negativo (293). Masimango et al. (219) indican que de 5 cepas, sólo una produjo una mayor cantidad de aflatoxinas en ausencia de luz.

Bennet et al. (28) consideran este factor como dependiente de la temperatura. Así, a temperatura óptima de crecimiento (25-30 °C), el peso de micelio seco es mayor en presencia de luz que en la oscuridad. A temperatura menos óptima (20-40°C) el crecimiento es mayor en oscuridad que con luz. En cuanto a la producción de aflatoxinas, a 30 y 15°C es superior en

oscuridad, mientras que a 20 y 25°C se produce una mayor cantidad en presencia de luz.

También debe tenerse en cuenta la acción que la luz solar tiene sobre las aflatoxinas ya formadas, acción que ha sido descrita por varios autores, y que se debería fundamentalmente a la radiación ultravioleta de la luz solar, que actuaría favoreciendo la hidrólisis de estas moléculas (151, 201).

#### I.2.c.7. Cloruro sódico

Se puede considerar que un elevado contenido en Cloruro sódico limitaría el crecimiento del hongo y por tanto la producción de aflatoxinas. Se ha comprobado que dicha producción se reduce notablemente si el porcentaje de ClNa en el sustrato alcanza el 4%; si llega al 6% resultaría incluso afectado el crecimiento del hongo, reducción que llega a ser muy notable con un 10%, para producirse la inhibición total del crecimiento con el 14%; Sin embargo, se ha descrito que la incorporación al sustrato de pequeñas cantidades de esta sal tienen un efecto positivo sobre la producción de aflatoxinas (331).

Debemos hacer referencia al hecho de que el contenido en sal de la mayoría de los quesos se encuentra entre el 0.7 y 2%,

niveles que no sólo no inhiben, sino que incluso estimulan la producción de aflatoxinas. No debemos considerar por tanto la sal como el factor limitante de la producción de aflatoxinas en el queso (174, 275, 331).

#### I.2.c.8. Sustancias antifúngicas

Son muchas las sustancias inhibidoras del crecimiento fúngico que se han ensayado por la industria con el fin de limitar la invasión por hongos de los alimentos y la consiguiente síntesis de micotoxinas. En líneas generales, nos ceñiremos a las principalmente utilizadas por la industria quesera, con la doble finalidad estética y sanitaria.

- El ácido sórbico es un antifúngico muy utilizado en la industria quesera que provoca una pérdida de viabilidad de las esporas de A. parasiticus, pero que a pesar de reducir el crecimiento del hongo no parece afectar su capacidad para sintetizar aflatoxinas (11, 279, 405). En general, los sorbatos retardan el crecimiento de hongos aislados de quesos (55), pero la mayor parte de las cepas son capaces de crecer en presencia de 0.3% de sorbato potásico.

- Los propionatos son utilizados a una concentración final de 0.1 a 0.3 % (55).

Tanto los propionatos como los sorbatos se muestran efectivos

únicamente cuando la contaminación fúngica es ligera.

- La pimaricina ha sido muy empleada por la industria quesera para eliminar los hongos de su superficie (55). Únicamente resulta eficaz si se utiliza antes del inicio del crecimiento del hongo, pues en otro caso no afecta a la capacidad de éste para producir aflatoxinas (186). A.flavus resulta particularmente sensible a la acción de este antifúngico (92).

#### I.2.c.9. Fenómenos de competencia microbiana

Los substratos naturales lógicamente no se encuentran contaminados por una sola especie microbiana, sino que existe una población muy heterogénea que compite por ese substrato. En el caso que nos ocupa, producción de aflatoxinas en productos lácteos, este fenómeno de competición tiene una enorme importancia, toda vez que A.flavus y A.parasiticus resultan ser malos competidores, siendo rápidamente inhibidos por otros hongos. Por otra parte, debe tenerse en cuenta la población bacteriana que normalmente poseen los productos lácteos, que pueden actuar directamente sobre el hongo, o sobre los metabolitos por él producidos.

A) Fenómenos de competencia se producen tanto con hongos pertenecientes a otros géneros, como con las diversas

especies del Género Aspergillus e incluso entre cepas de la misma especie.

Así, se ha descrito un efecto competitivo entre cepas aflatoxicogénicas y no aflatoxicogénicas de A.flavus, que se traduce en bajos o nulos niveles de producción de aflatoxinas (371).

Dentro del Género Aspergillus, la especie descrita con un mayor efecto inhibitor del crecimiento y producción de aflatoxinas es A.niger (129, 147, 214, 243, 371). Este efecto inhibitorio parece causado por la disminución del pH del sustrato desde un valor de 5.9-6.2 a 2.8-3 tras 7 días de incubación, pH suficientemente bajo como para inhibir la producción de aflatoxinas (73, 147). Asimismo, se ha descrito la capacidad de A.niger para degradar las aflatoxinas ya formadas (215, 371, Ashworth et al. citado en 394). Por contra, para otros autores esta capacidad de degradación de aflatoxinas por A.niger no existe (147).

Otras especies de Aspergillus en las que se ha descrito un efecto inhibitor son A.oryzae (211), A.sydowii y A.clavatus (214).

A.flavus también resulta parcialmente inhibido por Penicillium sp. y por tanto, reducida la producción de aflatoxinas (129, 394). Se ha descrito que en presencia de P.rubrum y P.italicum en un principio se produce una mayor cantidad de estas toxinas (a los 3 días), pero después se va degradando la toxina formada. A mayor inóculo de Penicillium,



mayor efecto negativo se produce (4). Otra especie inhibidora es P.funiculosum (214).

Por contra, se ha comprobado que P.purpureogenum o su metabolito la rubratoxina, pueden favorecer la producción de aflatoxinas por A.parasiticus incluso aunque el crecimiento pueda ser inhibido en parte (241).

Se ha descrito, en mayor o menor medida, el efecto inhibidor sobre la producción de aflatoxinas de Rhizopus sp. (243), Stachybotrys atra, Trichoderma viride, Fusarium oxysporum (214), Rhizopus nigricans y Saccharomyces cerevisiae (390).

B) En cuanto a la acción de las bacterias lácticas, se han comprobado dos tipos de fenómenos: por una parte pueden crecer de forma competitiva con A.flavus y A.parasiticus, dando lugar a una menor producción de aflatoxinas (101, 103, 398). Por otra parte, no sólo se ha descrito este efecto inhibitorio por parte de ciertas bacterias como Streptococcus lactis y Lactobacillus casei, sino también la capacidad que alguna de ellas tienen de degradar las aflatoxinas ya formadas, como ocurre con S.lactis (76) y L.plantarum (4).

En un cultivo mixto de S.lactis y A.flavus, se produjeron muy bajos niveles de la toxina tras 15 días de incubación, aunque el grado de crecimiento (expresado como peso de

micelio seco) fue similar al de un cultivo puro de A.flavus (76). Dentro de estas mismas experiencias se concluyó que S.lactis secreta un compuesto al medio que es capaz de inhibir la síntesis de aflatoxinas; este producto es dializable a partir de cultivos de S.lactis. En un principio se pensó que este compuesto podría ser el ácido láctico, pero se comprobó que A.flavus era capaz de producir la toxina en medios suplementados con ácido láctico. Por el contrario, Wiseman y Marth (398) observaron mayor cantidad de aflatoxinas en cultivos mixtos de A.parasiticus y S.lactis que en cultivos puros de la cepa toxicogénica. Por otra parte, al inocular conjuntamente A.parasiticus y L.casei, el crecimiento inicial del hongo fue más rápido, pero el total de aflatoxina producida fue comparable a la producida por el hongo en cultivo puro. Sin embargo, si se hace crecer durante 3 días L.casei antes de la inoculación del medio con A.parasiticus, el crecimiento de éste y la producción de aflatoxinas resulta considerablemente inhibida.

1.2.d. Determinación de aflatoxinas B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub> en muestras comerciales de productos lácteos

A lo largo del presente capítulo, haremos un seguimiento de los distintos trabajos que han ido apareciendo en la literatura sobre la presencia de aflatoxinas en productos lácteos, cuando éstas proceden del crecimiento directo del hongo sobre ellos, y no como consecuencia de la metabolización de las mismas por un animal productor de leche para dar lugar a la aparición de sus metabolitos hidroxilados en la misma.

Se han llevado a cabo distintos estudios obteniendo como resultado la ausencia de muestras de queso positivas a la presencia de aflatoxinas B o G (70, 114, 136, 179, 205, 273, 299, 329, Bulinski citado en 338, Laub y Woller citado en 338).

En la tabla 1.3 se muestra un resumen esquemático de los distintos muestreos que han dado resultado positivo de aparición de aflatoxinas B o G en productos lácteos comerciales.

Kiermeier (170) describió la detección de aflatoxina G<sub>1</sub> en muestras comerciales de queso Parmessano y Emmental, sin indicar porcentaje ni amplitud del muestreo.

Tabla I.3 .- Determinación de aflatoxinas B y G en muestras comerciales de queso

Tipo de queso	Muestras positivas	Observaciones	Autores
Parmessano	?	G <sub>1</sub>	Kiermeier, 1970
Emmental	?	G <sub>1</sub>	
Emmental	4 de 40	B <sub>1</sub> + G <sub>1</sub>	Kiermeier y Bohm, 1971
Gouda	2 de 6	G <sub>1</sub>	
Tilsit	9 de 47	B <sub>1</sub> + G <sub>1</sub>	
Edam	3 de 29	B <sub>1</sub> + G <sub>1</sub>	
Edelpilz	1 de 6	B <sub>1</sub>	
Jerome	1 de 4	B <sub>1</sub> + G <sub>1</sub>	
Cheddar	1 de 5	B <sub>1</sub> + G <sub>1</sub>	
Esrom	1 de 2	B <sub>1</sub> + G <sub>1</sub>	
Raucher	1 de 2	B <sub>1</sub>	
Romadur	3 de 27	B <sub>1</sub> + G <sub>1</sub>	
Parmessano	1 de 1	B <sub>1</sub>	
Romadur	7 de 34	B <sub>1</sub> + G <sub>1</sub>	
Tilsit	1 de 1	4 afl.principales	Kiermeier y Behringer, 1972
Queso para fundir	2 de 115		Kiermeier y Rumpf, 1975
No especifica	3 de 90		Jacquet et al., 1970
No especifica	7 de 26	15 µg/Kg B <sub>1</sub>	Paul et al., 1976
No especifica	2 de 248	1 µg/Kg B <sub>1</sub> 10.6 µg/Kg M <sub>1</sub>	Boutrif et al., 1977
Domiatí	4 de 81	25 µg/Kg B <sub>1</sub> y G <sub>1</sub>	Mahrous et al., 1980
Ras	8 de 52	20 µg/Kg B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> y G <sub>1</sub>	
No especifica	2 de 8	4 afl.principales	Parvaneh et al., 1982

Kiermeier y Bohm (176) llevaron a cabo un amplio estudio sobre distintos tipos de queso, encontrando presencia de aflatoxinas en distintos niveles en 34 de 222 muestras, correspondientes a distintos tipos de queso: Emmental, Gouda, Tilsit, Edam, Edelpilz, Jerome, Cheddar, Esrom, Raucher, Romadur y Parmessan. A este respecto conviene destacar, que como hemos indicado en el capítulo correspondiente, la producción experimental de aflatoxinas sobre queso Romadur no ha podido ser demostrada, lo que da cierta contradicción a estos resultados en que se produjo la detección de las toxinas en condiciones naturales.

Kiermeier y Behringer (173) en un estudio realizado sobre un queso comercial de tipo Tilsit identificaron 3 tipos de aflatoxinas: B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y G<sub>1</sub>. Debe resaltarse que este queso aparentemente no mostraba contaminación por hongos, y que por supuesto no había sido contaminado artificialmente. Al proceder al troceado de este queso, se encontraron 48 porciones positivas a B<sub>1</sub>, 5 a B<sub>2</sub> y 2 a G<sub>1</sub>. Es de destacar que aparecieron aflatoxinas en el centro del queso, sugiriendo que habían sido producidas en ese lugar, cuando en condiciones experimentales no se ha descrito crecimiento de Aspergillus en el interior del queso.

Kiermeier y Rumpf (183) analizaron 115 muestras comerciales de queso para fundir, de las que sólo dos contenían aflatoxinas, aunque no especifican cuál de ellas.

Jacquet et al. (150) describieron la identificación de aflatoxinas en 3 de 90 muestras de queso.

Paul et al. (264) en queso sin especificar llevaron a cabo un estudio de 26 muestras, describiendo un 23.1% de positivas, con un nivel medio de  $B_1$  de 15  $\mu\text{g/Kg}$ ;  $B_2$  y  $G_1$  sólo fueron detectadas en el 3.8% de las muestras, y  $G_2$  y  $M_1$  en ninguna.

Boutrif et al. (39) en queso (sin especificar tipo) encontraron 2 muestras positivas de 248, con un nivel de  $B_1$  de 1  $\mu\text{g/Kg}$ .

Mahrous et al. (210) detectaron aflatoxinas en muestras comerciales de queso Domiati y Ras. En el primero, de 81 muestras, el 4.9% resultaron ser positivas. En queso Ras, de 52 muestras el 7.7% fueron positivas en la porción central del queso, y el 15.38% en la corteza.

Bullerman (55) en queso (sin especificar tipo), encontró una muestra positiva a  $B_1$ .

Farvaneh et al. (257) encontraron en queso (sin especificar tipo), 8 muestras positivas a aflatoxinas.

Con respecto a otros productos lácteos distintos del queso, Sharmanov et al. (328) aislaron aflatoxina  $B_1$  en 10 muestras de leche desecada y reconstituida, en niveles de 0.1-0.5

- 78 -

µg/l, lo que fue atribuido al incorrecto almacenaje de dicho producto lácteo.

### 1.3. TECNICAS DE DETERMINACION DE AFLATOXINAS EN LECHE Y PRODUCTOS LACTEOS

Las aflatoxinas B y G no suelen encontrarse en condiciones naturales en leche, y por tanto son pocos los métodos analíticos descritos para ellas, aun cuando en ciertos productos lácteos, como el queso, se hace necesaria su determinación. En general, podemos considerar que la mayoría de los métodos descritos para  $M_1$  son válidos también para esas aflatoxinas.

Otro punto a considerar es que métodos válidos para un producto lácteo, pueden no serlo para otro; esto sucede fundamentalmente en el queso, ya que debido a su gran contenido en grasa, pigmentos y otras sustancias producidas en la maduración dificultan notablemente la extracción y purificación de las muestras con aflatoxinas (170).

La aflatoxina  $M_1$  normalmente se encuentra en leche en muy bajos niveles; como consecuencia de ello, es preciso conseguir una técnica con un límite de detección mínimo de 0.1 a 5 ppb, e incluso inferior. De aquí, que los métodos deban ser muy sensibles para poder determinar esas cantidades mínimas de aflatoxina. Además, los métodos analíticos deben cumplir las características de rapidez, economía y precisión si han de ser utilizados de forma rutinaria en el análisis de



alimentos. Es a menudo difícil aunar todas esas características en una sola técnica, y por tanto, alguna de ellas debe ser sacrificada en beneficio de otras.

Existen básicamente 2 tipos de metodologías que han sido desarrolladas para el análisis de aflatoxinas: métodos biológicos y métodos fisicoquímicos.

#### I.3.a. Análisis biológico

Se trata de técnicas semicuantitativas basadas en el efecto de las aflatoxinas sobre un organismo o tejido. Debido al bajo nivel en que se encuentran normalmente las aflatoxinas en los productos lácteos, esta metodología no es normalmente empleada para estos alimentos.

Dentro de estos métodos biológicos citaremos los más significativos:

- Test sobre embrión de pollo: Es un método simple, reproducible y sensible. En embriones de pollo de 5 días se pueden detectar cantidades tan bajas como 0.3 µg de aflatoxina B<sub>1</sub>, muy inferior a la detectada en otros tests biológicos. La sensibilidad a las aflatoxinas disminuye rápidamente con el incremento de edad del embrión (271).

- Test sobre patitos de un día: Ha sido ampliamente utilizado, más que por la investigación del efecto letal, por la producción de cambios degenerativos en el hígado, representados por la proliferación del conducto biliar. Esta respuesta puede apreciarse pocos días después de la aplicación de una dosis única de aflatoxinas. Su inconveniente es que ésta es una reacción no específica, que puede ser provocada por muchos tóxicos. La mínima concentración de aflatoxina B<sub>1</sub> requerida para producir proliferación del conducto biliar ha sido fijada en 40 µg/Kg (129).

- Test sobre larvas de crustáceos: Artemia salina es un crustáceo de aguas salobres que ha sido muy utilizado en la detección de aflatoxinas, lo que ha sido facilitado por su bajo coste. Una cantidad de aflatoxinas de 0.5 µg/ml provoca la muerte del 60% de las larvas, y si se aplica el doble se afecta el 90% (46).

- Test sobre cultivos celulares: Se basa en el efecto mitótico que sobre distintos tipos de cultivos celulares ejercen las aflatoxinas. Principalmente se utilizan células de hígado, riñón o fibroblastos.

- Test sobre bacterias: Se basa en la inhibición que sobre el crecimiento de algunas bacterias ejercen las aflatoxinas. De 329 microorganismos investigados, fue el Bacillus megaterium el que presentó una respuesta más

sensible frente a las aflatoxinas (62). Por esta técnica se pueden evidenciar hasta 1 µg de B<sub>1</sub> (74).

- Test sobre trucha arco iris: Se basa en la susceptibilidad que tienen estos peces para contraer cánceres primarios de hígado cuando se les administra una dieta con aflatoxinas. Se pueden detectar por esta metodología concentraciones de hasta 20 µg/Kg de B<sub>1</sub>.

- Test sobre rata: Se trata de un animal sólo moderadamente sensible a las aflatoxinas, por lo que no es muy utilizado como test biológico.

- Test sobre monos: Constituyen el mejor modelo para el estudio biológico desde el punto de vista de extrapolación de datos de toxicidad al hombre, aunque su elevado coste no hace práctico su uso como método biológico de detección de aflatoxinas.

### 1.3.b. Análisis Físico-químico

Estos métodos se basan en la observación de una característica física o química de las aflatoxinas, que resulta medible. con objeto de poder llevar a cabo su cuantificación. Ejemplos de éstas son la absorción de la luz ultravioleta, la fluorescencia o el cambio de color cuando se

produce una reacción química. La intensidad de la fluorescencia es proporcional a la cantidad de aflatoxinas presente en una muestra, y es el carácter más utilizado para identificar y cuantificar estos compuestos tóxicos.

La gran mayoría de los métodos cuantitativos para aflatoxinas incluyen una serie de etapas comunes: (a) Toma de muestras; (b) Extracción de las aflatoxinas; (c) Limpieza para eliminar lípidos y sustancias interferentes en general; (d) Separación; (e) Cuantificación. Los diversos métodos descritos en la literatura difieren en alguna de estas etapas, pero pueden ser idénticos en otras.

#### 1.3.b.1. Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Las principales diferencias entre las diversas metodologías descritas se sitúan en las etapas anteriores a la CCF en sí. Los primeros métodos descritos (107, 149, 297) utilizaban una mezcla acuosa de un solvente orgánico para extraer la  $M_1$  de la leche. La extracción va seguida de la precipitación de las proteínas, desengrasado con hexano, solubilización de la  $M_1$  en cloroformo, y en muchos de ellos limpieza por utilización de una columna cromatográfica. Posteriormente la  $M_1$  es separada y cuantificada utilizando CCF.

Stubblefield et al. (356) evaluaron varios de esos métodos y encontraron como más apropiado el de Jacobson et al. (149):

otro método muy similar fue desarrollado por Pons et al., del cual se estableció un estudio colaborativo (277), siendo seleccionado como oficial por la Asociación Americana de Químicos Analíticos (ADAC). Este método tiene la ventaja de que puede ser utilizado para diversos productos lácteos, permitiendo un límite de detección de 0.1 ppb. Estos estudios colaborativos se basan en que analistas de distintos laboratorios determinan las aflatoxinas utilizando el mismo método y muestras del mismo alimento, lo que sirve para formar un juicio de valor sobre un método determinado, y hacer recomendaciones de su utilidad (52).

Schuller et al. (324) desarrollaron un método basado en la utilización de Celite, con desarrollo bidimensional, y que alcanzaba un límite de detección de 0.05 ppb.

Tuinstra y Bronsgeest (372) utilizaron un procedimiento de limpieza en columna cromatográfica, con desarrollo bidimensional, con un límite de detección de 0.004 ppb. Debido a este bajo límite de detección y a su mínimo grado de error constituye una buena alternativa al método de Pons et al. (277).

Stubblefield (353) describió un método que utiliza un procedimiento de extracción directa de  $M_1$  de la leche con cloroformo; el proceso de limpieza y desengrasado se realiza en una columna cromatográfica. El límite de detección es 0.1 ppb, superior al de Schuller et al. (324) y Tuinstra y

Bronsgeest (372), pero que presenta la ventaja de su rapidez. Este método, tras estudio colaborativo entre diversos autores (357), fue admitido como oficial por la AOAC (16), y escogido como método de referencia por la Unión Internacional de Químicos (IUPAC). Ajustando los volúmenes en este método se puede llegar a determinar 0.01 ppb (61).

Un factor común que constituye un problema en todos estos métodos es el grado de recuperación de  $M_1$ . Los solventes utilizados para la extracción de la toxina a menudo establecen una diferencia apreciable en esta recuperación, posiblemente porque la toxina puede ser "secuestrada" o puede interaccionar con distintos componentes de los productos lácteos, principalmente la caseína, que hacen dificultosa su extracción. A pesar de esto, en la actualidad, la metodología de CDF es la más utilizada para el análisis de aflatoxinas en los distintos laboratorios del mundo.

#### 1.3.b.2. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (CLAE)

Esta metodología en general tiene la ventaja de ser más sencilla y rápida, y dar resultados mas homogéneos que la CDF, pero tiene la desventaja de ser mucho más costosa.

Winterlin et al. (396) describieron un método rápido capaz de detectar 0.1 ppb. Este procedimiento incluye la separación de la  $M_1$  por transferencia directa de 10 ml de leche a una

columna Sep-Pack-C18. La  $M_1$  es eluida de esta columna con un solvente apropiado, diluida a un volumen conocido e inyectada en CLAE. La separación se realiza utilizando una columna de fase reversa, y la cuantificación se lleva a cabo por medida de su fluorescencia.

Blanc (23) desarrolló un método con 0.05 ppb como límite de detección. Beebe y Takahashi (26) utilizaron por primera vez el ácido trifluoroacético como paso previo para transformar  $M_1$  en  $M_{2a}$  y que pueda así ser detectada con mayor facilidad, con un límite de detección de 0.3 ppb. Fremy y Boursier (116) con un método parecido consiguen 0.05 ppb.

CCF y CLAE se complementan en el análisis de aflatoxinas en leche y productos lácteos, siendo la primera preferible cuando se trate de muestras de distinto origen, y la segunda cuando las muestras sean uniformes (212). Aunque CLAE es más exacta que CCF, pierde una o más de las siguientes características: economía, rapidez, porcentaje de recuperación o límite de detección (406).

### 1.3.c. Inmunoanálisis

Esta metodología se basa en la interacción de las aflatoxinas con un anticuerpo específico, obtenido normalmente en conejos. En este apartado se incluyen el Radioinmunoanálisis

(RIA) y el Enzimoimmunoanálisis (ELISA), cuyos límites de detección son 2-5 ppb y 0.25 ppb respectivamente. La situación actual de estas técnicas ha sido recientemente revisada por distintos autores (85, 86, 267).

A diferencia de las toxinas bacterianas, que suelen ser fuertemente inmunogénicas, las aflatoxinas son metabolitos secundarios de bajo peso molecular, de aquí que no sean antigénicas y deban ser conjugadas a una proteína para llevar a cabo la inmunización. Las aflatoxinas carecen de grupo reactivo, por lo que antes de proceder a su conjugación a proteínas debe realizarse la introducción en la molécula de aflatoxina de este grupo reactivo que normalmente suele ser un grupo carboxilo. En el caso de B<sub>1</sub> y M<sub>1</sub> se utiliza el Carboximetil Oxime.

Aunque la albúmina sérica bovina (BSA) es la proteína más frecuentemente utilizada para la unión, también pueden ser empleadas la gammaglobulina bovina o una proteína sintética, la polilisina. Debemos tener en cuenta que el grupo reactivo puede ser introducido en diferentes lugares de la cadena de la misma molécula de aflatoxinas para su posterior conjugación.

Una vez que se ha preparado el conjugado, el anticuerpo suele ser producido en conejos por inoculación de una mezcla de conjugado y adyuvante completo de Freund en diversos lugares del dorso del animal.

Transcurridas entre 5 y 7 semanas de la inoculación inicial, el suero del conejo presenta ya un título suficiente frente a



las aflatoxinas como para poder ser utilizado en su detección.

Aunque se han utilizado cabras para la producción de anticuerpos frente a aflatoxinas, los títulos son más bajos que los obtenidos en conejos.

Como la inmunización se ha efectuado con aflatoxina conjugada a través de la porción ciclopentano de la molécula, los anticuerpos generalmente reconocerán la porción dihidrofurano de la molécula. Cuando los conjugados se preparan a través de la parte de dihidrofurano, tal como se hace en aflatoxina B<sub>2</sub>, el anticuerpo tiene una especificidad hacia el anillo ciclopentano.

Tanto RIA como ELISA se basan en la competencia de unión entre toxina no marcada (procedente de la muestra) y toxina marcada (procedente del sistema de análisis) por lugares de unión específica al anticuerpo. En el RIA se utiliza toxina marcada radiactivamente, mientras que en el ELISA es un conjugado toxina-enzima.

- El procedimiento RIA incluye la incubación simultánea de la muestra problema disuelta en fosfato buffer con una cantidad constante de toxina marcada y anticuerpo específico. La toxina libre y la ligada son entonces separadas por una técnica apropiada, y determinada la radiactividad. La concentración de toxina de la muestra problema se determina por comparación de los resultados en una curva standard

establecida previamente con cantidades conocidas de toxina marcada.

- La técnica ELISA utilizada para el análisis de aflatoxinas es la denominada ELISA competitivo heterogéneo, en que la actividad enzimática permanece inalterable después de su unión a anticuerpos específicos, con lo que es necesario la separación de la forma libre y ligada de la toxina. Normalmente se utiliza Peroxidasa de rábano picante como sistema enzimático.

En esta metodología los anticuerpos específicos de aflatoxina son primero unidos a una fase sólida, tal como puede ser una microplaca. Una vez que el anticuerpo se encuentra revistiendo la placa es estable durante 3-6 meses. La placa debe ser lavada con buffer antes de su uso. La muestra se incuba conjuntamente con el conjugado enzimático, o bien puede ser incubada separadamente en dos etapas distintas. La placa se lava de nuevo y el enzima residual unido a la placa es entonces determinado por incubación con una solución conteniendo peróxido de hidrógeno y apropiados cromógenos oxidables. El color resultante es medido espectrofotométricamente o por comparación visual con standards.

La técnica ELISA es aproximadamente 10 a 50 veces más sensible que el RIA, y además, se muestra superior por cuanto por una parte elimina la utilización de compuestos radiactivos, siempre peligrosos, y por otra es más rápida,

concediéndosele un gran futuro como método de análisis rutinario de M<sub>1</sub> (85, 267).

Aun cuando han sido descritas varias técnicas de análisis por ELISA (30, 31, 119, 218, 266), en la actualidad esta metodología todavía no se encuentra plenamente desarrollada, no pudiendo competir todavía con los métodos cromatográficos (377).

#### 1.3.d. Métodos de confirmación de aflatoxinas

En orden a minimizar la posibilidad de descripción de falsos positivos, debe confirmarse la identidad de la sustancia identificada como aflatoxina M<sub>1</sub> en las muestras inicialmente consideradas como positivas.

El método más seguro para llevar a cabo esta confirmación es la espectroscopía de masa de alta resolución, pero su utilización requiere excesivo tiempo y además no todos los laboratorios disponen de esta metodología, por lo que se prefiere la utilización de técnicas químicas. Un ejemplo de método confirmatorio es el de Van Egmond et al. (378), en que la mancha problema es derivatizada sobre la placa de CCF por la superposición de ácido trifluoroacético sobre ella, proceso seguido de calentamiento de la placa a 75°C para que se produzca la reacción. La naturaleza química exacta del

producto de la reacción que se forma no es bien conocida. Si la reacción se lleva a cabo en un tubo de ensayo, se forma el hemiacetal de  $M_1$ , resultante de la adición de agua al anillo furano terminal. Sin embargo, sobre la placa de CCF, el producto principal formado es otro, con un  $R_f$  distinto al del hemiacetal, y con fuertes propiedades fluorescentes que permiten su identificación.

#### 1.4. TOXICIDAD DE LAS AFLATOXINAS

La actividad biológica de las aflatoxinas incluye su función como potentes tóxicos, carcinógenos, teratógenos y/o mutágenos (130, 206).

Las propiedades tóxicas de las aflatoxinas se pueden manifestar de diferente forma de acuerdo con una serie de factores, entre los que se incluyen: (a) método de estudio utilizado, (b) dosis suministrada y (c) duración de la exposición. También existe variación de la sensibilidad entre las diferentes especies animales. Además hay que considerar una susceptibilidad individual a las aflatoxinas dependiente no sólo de la especie y raza, sino también de la edad, sexo, estado metabólico, estado nutricional del individuo y estado sanitario.

En la tabla 1.4 se indica una relación de los valores de la DL50 de las aflatoxinas para 10 especies animales.

La mayoría de los estudios metabólicos y tóxicos con aflatoxinas se han centrado en la B<sub>1</sub> por ser la de propiedades tóxicas más potentes, además de ser la más común en los productos agrícolas.

Debemos tener en cuenta que cambios relativamente pequeños

Tabla I.4 .- DL50 de la aflatoxina B<sub>1</sub> en distintas especies animales

Especie	DL50 (mg/Kg P.V.)
Pato	0.3 - 0.6
Cerdo	0.6
Trucha	0.8
Perro	1
Cobaya	1.4 - 2
Oveja	2
Mono	2.2
Rata	5.5 - 17.9
Pollo	6.3
Ratón	9

en la estructura química de la molécula modifican considerablemente su actividad biológica. Así, por ejemplo, el dihidro derivado de la aflatoxina B<sub>1</sub>, la B<sub>2</sub>, es mucho menos tóxica que B<sub>1</sub>, con un valor de DL50 en patitos de 1.7 mg/Kg P.V. en comparación con los 0.3-0.6 de la B<sub>1</sub>.

Se ha descrito que las diferentes especies de animales domésticos, entre las que se puede citar a los bóvidos, óvidos, patos, pavos y pollos, que consumen dosis subletales de estas toxinas durante cierto número de días, desarrollan un síndrome tóxico cuya manifestación más característica es la lesión hepática que se origina. La dosis total de toxina suministrada a lo largo de los días para conseguir esta lesión hepática varía de 0.3 a 15 ppm (46).

Desde un punto de vista muy general, los efectos biológicos de las aflatoxinas pueden ser diferenciados en dos grupos (53):

A) Intoxicación aguda: A elevadas dosis las aflatoxinas son hepatotóxicas, produciendo además un cuadro hemorrágico gastrointestinal que indefectiblemente acaba en la muerte del animal. El cuadro sintomatológico suele completarse con anorexia, pérdida de peso, decaimiento, anormalidades neurológicas, ictericia y convulsiones. Las lesiones hepáticas son evidentes, presentándose el hígado pálido con zonas de necrosis y degeneración grasa. Puede haber además acúmulo de líquidos en las cavidades corporales y hemorragias

en riñón.

B) Intoxicación crónica: Las aflatoxinas son capaces de inducir tumores hepáticos, incluso en cantidades de pocos microgramos. Como consecuencia de su ingestión, se produce una proliferación del conducto biliar con fibrosis del mismo. El cuadro terminal suele ser una cirrosis hepática de la que el signo más característico es la ictericia. Aunque el hígado es el principal lugar de asentamiento de las neoplasias, también se pueden inducir tumores en otros órganos, principalmente en el tracto digestivo y glándulas anexas (esófago, estómago, duodeno, colon y gl.salivares). La aflatoxina G<sub>1</sub> parece ser que induce principalmente la formación de tumores en riñón, lo que raramente produce la B<sub>1</sub> (64).

Por las características clínicas que el consumo de aflatoxinas produce en los animales, algunos autores han sugerido la necesidad de una transformación metabólica en el interior del organismo de la molécula de aflatoxina en otra que sería la verdaderamente lesiva (69). Una evidencia más directa de la existencia de este proceso de activación metabólica se tuvo al comprobar que se produjeron derivados radiactivos unidos covalentemente a ácidos nucleicos y proteínas del hígado tras la administración de B<sub>1</sub> tritiada a ratas (202). Se ha demostrado que la aflatoxina B<sub>1</sub> requiere un proceso de activación metabólica por el sistema oxidativo microsomal para formar una molécula activa, que se ha aceptado es el 8,9 epóxido de la B<sub>1</sub> (en un principio



denominado como 2,3 epóxido). Este compuesto puede formar uniones covalentes con los ácidos nucleicos y proteínas nucleares, transformándolos en biológicamente inactivos (Garner, citado en 11). Una segunda vía para activación de la aflatoxina B<sub>1</sub> podría ser la transformación en su hemiacetal, aflatoxina B<sub>2a</sub>, y fué propuesta por Patterson y Roberts (262). Esta molécula pierde su actividad tóxica al ser suministrada por vía oral, lo que podría explicarse porque al ser una molécula que presenta una fuerte avidez por algunos radicales peptídicos, fácilmente podría ser secuestrada y bloqueada en el tracto intestinal. La biotransformación de B<sub>1</sub> a su hemiacetal es más efectiva en el hígado de especies con una alta susceptibilidad al envenenamiento agudo por aflatoxinas.

Por tanto, aflatoxina B<sub>2</sub> y un hipotético epóxido-B<sub>1</sub> son consideradas las formas activas de la molécula de B<sub>1</sub>, mientras que el resto de metabolitos producidos son considerados productos de detoxificación (27).

Como hemos indicado anteriormente, se han desarrollado detallados estudios sobre la relación dosis-respuesta cuando se utiliza B<sub>1</sub> como inductora de tumores. Antiguos estudios sobre inducción tumoral, usando aproximadamente 10 µg de B<sub>1</sub> por día en ratas, hicieron pensar que esta sustancia es el más potente hepatocarcinógeno natural activo por vía bucal (11, 115).

Las otras aflatoxinas principales. G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y G<sub>2</sub> son también consideradas carcinógenos, aunque menos potentes que la B<sub>1</sub>.

La administración de 3 µg/ml de G<sub>1</sub> en agua de bebida desarrolló tumores hepáticos en 21 de 26 ratas después de que habían consumido un total de 6 mg de la toxina. 6 de esos animales desarrollaron también tumores renales.

La aflatoxina M<sub>1</sub> también podría ser carcinogénica, hecho que no ha sido probado concluyentemente (44). Si bien su toxicidad aguda parece ser similar a la de B<sub>1</sub> (80, 132, 206, 281), su carcinogenicidad es menor (119, 263, 296, 339, 377, 407). Este hecho parece estar relacionado con el hecho de que la toxicidad aguda depende de la propia molécula, que es muy similar en ambos casos, mientras que la carcinogenicidad dependería de su posible proceso de activación metabólica (71).

Finalmente indicar que se ha comprobado que las aflatoxinas inducen deficiencias en la respuesta inmune. Se ha comprobado que estos compuestos tóxicos bloquean la producción de interferón en pavos, reducen la actividad del complemento en cobayas, reducen la actividad fagocítica de macrófagos de conejo. Aparentemente ejercen sus efectos sobre la respuesta inmunológica, al menos en parte, a través de los linfocitos T.

#### 1.5. TOXICIDAD DE LAS AFLATOXINAS EN EL HOMBRE

Es obvio que la demostración de la susceptibilidad humana a las aflatoxinas es difícil de comprobar toda vez que no hay datos sobre experiencias toxicológicas en personas. Por tanto, lo que se ha hecho es extrapolar los resultados de las investigaciones en animales al hombre. Para llevar a cabo estas extrapolaciones resultan de elección las experiencias realizadas con primates. Además se han realizado observaciones muy útiles sobre la sintomatología que presentaban personas sospechosas de consumir alimentos contaminados con estas toxinas, pudiendo comprobar así el efecto que desarrollan sobre el organismo humano (27).

El hecho de que muchas especies animales sean susceptibles tanto de forma aguda como crónica a las aflatoxinas viene a evidenciar que el hombre también resultaría afectado y no tiene por qué constituir una excepción como especie resistente. Esto es particularmente cierto cuando se trata de observaciones realizadas en animales fisiológicamente similares al hombre tales como primates y cerdo.

La incidencia de las aflatoxicosis en animales es más alta que en el hombre, lo que tampoco es sorprendente y no significa que los animales sean más susceptibles a las aflatoxinas que el hombre; simplemente indica que los animales están más comunmente expuestos a ellas,

principalmente por el tipo de alimentos consumidos (53).

#### I.5.a. Toxicidad aguda

Se han publicado distintos trabajos que asocian las aflatoxinas con la intoxicación aguda en el hombre.

Shank (citado en 53) describió un caso en que 26 personas en 2 pueblos de Taiwan resultaron afectadas; se trataba de 3 familias de un total de 10 hogares. En 5 de éstos se había consumido arroz enmohecido, y miembros de la misma familia residentes en otras casas que no consumieron ese arroz no padecieron la enfermedad. Se produjeron un total de 3 muertos, todos niños, de 4, 5 y 6 años. Los síntomas de la enfermedad fueron edema en extremidades inferiores, dolores abdominales, vómitos, hepatomegalia y ausencia de fiebre. Se analizaron muestras del arroz considerado responsable del proceso y resultó que contenía 200 µg/Kg de aflatoxina B<sub>1</sub>.

Otro caso descrito en la bibliografía se produjo en Uganda, en el que resultó afectado un chico de 15 años (325), al que se le apreciaron los mismos síntomas del caso anterior: dolor abdominal, edema en las piernas, hepatomegalia y ausencia de fiebre. El estudio anatómo-patológico reveló una serie de alteraciones que incluyeron edema pulmonar, degeneración del

músculo cardíaco, necrosis y degeneración grasa hepática. La dieta de este joven estaba constituida fundamentalmente por torta de harina de mandioca, que se comprobó estaba contaminada con 1.7 mg aflatoxina /Kg. La extrapolación de datos experimentales obtenidos en primates, y el cálculo de la cantidad de alimento consumido por el chico durante un periodo de varias semanas indicó que fácilmente podría haber consumido una dosis letal. Dos niños de la misma familia estuvieron afectados con los mismos síntomas, pero consiguieron recuperarse, especulándose con el hecho de que habían consumido una menor cantidad del alimento contaminado, estando por tanto expuestos a dosis subletales.

Estudios realizados en Thailandia mostraron que el síndrome de Reye, que se produce en el Nor-Este del país con caracter epidémico podría estar relacionado con la ingestión de aflatoxinas. Se trata de una enfermedad que afecta fundamentalmente a niños, y se caracteriza por vómitos, hipoglucemia, convulsiones, para posteriormente entrar el enfermo en coma y frecuentemente terminar en muerte. El examen anatómo-patológico revela edema cerebral y degeneración grasa de hígado, riñón y corazón.

En un caso fatal en un niño de 3 años se encontró que había ingerido sobras de arroz hervido durante 2 días antes de caer enfermo; ese arroz resultó estar enmohecido, y se comprobó que contenía más de 10 mg de aflatoxina total/Kg.

En la autopsia de varios casos del síndrome de Reye en Thailandia se ha encontrado aflatoxina B<sub>1</sub> en los tejidos en

22 de 23 casos, resultando en 2 de ellos el nivel de toxina detectado similar al de tejidos de primates a los que se había administrado la DL50 (326).

En estudios efectuados con casos de cirrosis hepática infantil en India se encontró que de 16 madres de niños que sufrían esta enfermedad, 4 secretaban un compuesto en la leche que parecía ser B<sub>1</sub>, y una secretaba M<sub>1</sub>. Asimismo, se detectó B<sub>1</sub> en la orina de los niños cirróticos (240).

En un brote de aflatoxicosis en India (17) se produjeron 397 afectados, con 108 muertos. El análisis histopatológico mostró una extensiva proliferación del conducto biliar con fibrosis periportal y hemorragias gastrointestinales. Asimismo, los enfermos presentaron un cuadro icterico, desarrollando rápidamente una ascitis por hipertensión portal.

Krishnamachari (citado en 66) describió un brote epidémico de hepatitis caracterizado por ictericia e hipertensión portal, y que se atribuyó al consumo de maíz. Según cálculos efectuados, las personas afectadas habían consumido de 2-6 mg de aflatoxinas diarios durante 1 mes. La mortalidad superó el 20%

Amla et al. (citado en 69) describió en la India un caso en que 20 niños, con una edad comprendida entre 1.5 y 5 años, habían sido alimentados con una dieta suplementaria de 30-60g

de harina de cacahuete, en que más tarde se demostró la presencia de  $B_1$  en una proporción de 0.3 mg/Kg. Se estimó que la ingesta diaria de aflatoxinas fué de 9-18  $\mu$ g, con una media de 1.1  $\mu$ g/Kg P.V.. El alimento fué consumido en periodos de tiempo comprendidos entre 5 días y 1 mes. Estos niños presentaron un año después un cuadro característico de degeneración grasa en unos casos, y cirrosis hepática en otros.

En Senegal, Payet et al. (citado en 69) describieron que niños de menos de un año ingirieron de 70 a 140 g diarios de harina de cacahuete contaminados con 0.5-1 mg/Kg de aflatoxinas durante 10 meses, lo cual supone una ingesta diaria de 35-140  $\mu$ g/día. Uno de estos niños presentó anomalías en la estructura de su hígado, que persistían 6 años después.

Entre los años 1972-76, 27 niños con edades comprendidas entre 3 días y 8 años murieron de aflatoxicosis en Checoslovaquia (158); esos niños murieron de 1 día a 4 meses después de la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad. En 4 de los niños se detectó  $M_1$  en el hígado en cantidades de 0.8-20  $\mu$ g/Kg de tejido hepático. En 16 niños se encontró  $B_1$  en hígado en una proporción de 20-2760  $\mu$ g/Kg. En 11 no se llegó a determinar  $B_1$ , mientras que sí se detectó en residuos de alimentos de 4 niños en un nivel de 120-5400  $\mu$ g/Kg. En los cereales que constituían el desayuno de otro niño se detectó  $B_1$  en una proporción de 20  $\mu$ g/Kg.

También en Checoslovaquia, se detectó B<sub>1</sub> en los tejidos de 2 hombres con cáncer de pulmón. Asimismo, en 5 de 15 pacientes con cáncer hepático. La cantidad de B<sub>1</sub> en el hígado de estos enfermos variaba de 0.35-5.2 µg/Kg; en uno de estos casos se reveló la existencia de una exposición profesional a *Aspergillus*. Sin embargo en los otros casos no se recogió información sobre cómo se había podido producir la exposición a B<sub>1</sub>.

En el tejido hepático de 5 niños checoslovacos muertos de síndrome de Reye se detectó B<sub>1</sub> en concentraciones de 120-810 µg/Kg (352). La microscopía de fluorescencia reveló una mayor fluorescencia en ciertas secciones del hígado, principalmente alrededor de la periferia del espacio portal y venas centrolobulares.

Tsuboi et al. (370) llegaron a detectar B<sub>1</sub> en muestras de suero de hombres sanos en Japón, en concentraciones de 20-56 pg/ml.

Coulter et al. (81) investigaron la presencia de aflatoxinas en madres sudanesas; para ello tomaron leche de 99 madres, y en 15 de ellas, a las que hubo de practicárseles cesárea, tomaron además muestras de suero y grasa abdominal, para comprobar si las aflatoxinas se acumulaban en este tejido y si a partir de él podían ser liberadas a la leche. En cuanto a los resultados, 37 de 99 muestras de leche contenían M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> o ambas. En suero detectaron aflatoxinas en 4 de 15 madres, mientras que no fueron detectadas en ninguna de las 15



muestras de grasa abdominal.

La sintomatología de todos estos casos de posibles aflatoxicosis en personas guardan una estrecha relación con los signos clínicos de las intoxicaciones agudas en animales. El hecho de que suelen afectarse fundamentalmente los niños, sugiere que las personas jóvenes serían más receptivas que los adultos, como sucede en los animales.

#### 1.5.b. Toxicidad crónica y carcinogenicidad

Junto con la problemática de la intoxicación aguda, existe la posibilidad de ingestión de bajos niveles de aflatoxinas durante largos periodos de tiempo, quizá intermitentemente dependiendo de la estación (17).

La incidencia de cáncer primario hepático varía a lo largo del mundo con mayor incidencia en regiones tropicales de Africa, Sur del Sahara, India, Sud-Este Asiático, Japón y Filipinas (66).

Se han llevado a cabo estudios sobre la relación existente entre el consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas y la incidencia de cáncer hepático en determinadas zonas del mundo. Estos trabajos fueron realizados fundamentalmente en los años 60, y han sido cuestionados posteriormente por

ciertos autores, como Appleton (14), quien pone en duda la validez de estas extrapolaciones matemáticas a la luz de los nuevos conocimientos sobre la biología del cáncer hepático, concluyendo que la ingestión de bajos niveles de aflatoxinas no explicaría adecuadamente la incidencia de cáncer hepático por cuanto influyen otros factores predisponentes no tenidos en cuenta en muchos de esos estudios, como el virus de la hepatitis B y la cirrosis alcohólica, sobre todo en países desarrollados.

En Europa y Norteamérica la mayoría de los hepatocarcinomas tienen lugar en pacientes cirróticos. Esto ha llevado a pensar que la cirrosis predispone al carcinoma. También se ha sugerido que la hepatitis B juega un papel significativo en la inducción del carcinoma hepático. Apoyando esta idea, en muchas áreas del mundo donde el hepatocarcinoma es común, hay una alta incidencia de antígeno de hepatitis B en los pacientes con carcinoma. Sin embargo esta correlación muestra una considerable variación a través del mundo (65).

La interpretación de los estudios epidemiológicos para establecer una posible correlación entre ingestión de aflatoxinas y cáncer primario hepático presenta una serie de factores complicantes (69):

a) El desconocido periodo de inducción del hepatoma, probablemente largo y variable, que obliga a la hora de confeccionar los estudios epidemiológicos a retrotraerse

bastante en el tiempo, con el problema que ello implica de falta de datos.

b) La media de exposición de una población a un producto contaminado no refleja la distribución ni el nivel de exposición individual, particularmente cuando la población objeto de estudio no es homogénea.

c) Los datos sobre identificación del cáncer, registro y censo son normalmente escasos en las zonas de mayor incidencia de hepatomas.

d) No se consideran la mayoría de las veces otras posibles causas no bien conocidas de cáncer hepático, tales como otras micotoxinas, o el efecto de la dieta como factor predisponente.

Ciertos investigadores especulan sobre las posibles concomitancias existentes entre deficiencia en piridoxina, personas que han consumido aflatoxinas y el carcinoma hepático en Africa, sugiriéndose que la alta incidencia de cirrosis hepática y carcinoma en Africa puede ser debida a la siguiente suma de factores: Por una parte dietas pobres en piridoxina o que contienen antagonistas de la piridoxina y por otra dietas que esporádicamente pueden contener aflatoxinas. Así pues, la acción de aflatoxinas y la deficiencia en piridoxina pueden mostrarse como factores sinérgicos en la producción de la lesión hepática (72).

En principio, los estudios epidemiológicos de poblaciones con una elevada incidencia de cáncer hepático implican a las aflatoxinas como una posible causa de esa incidencia; pero cuando la evidencia se examina en detalle, se encuentran serios fallos en esta conclusión, e investigaciones adicionales realizadas en fechas recientes en las mismas áreas implican al virus de la hepatitis B como el posible culpable (347).

En Uganda, donde la incidencia de hepatocarcinomas es alta, los alimentos se encuentran fuertemente contaminados con aflatoxinas; además, existe una distribución geográfica de la contaminación por estas toxinas de los alimentos, que se corresponde con la incidencia geográfica de cáncer hepático en ese país (5). En el periodo comprendido entre 1966-67 se siguió la incidencia de hepatomas primarios en distintas tribus; en este estudio se determinaron los niveles de aflatoxinas en 480 muestras de alimentos almacenados para su consumo, de las que aproximadamente el 30% contenían niveles detectables de aflatoxinas y el 3.7% contenían más de 1 µg/Kg. La incidencia de hepatomas primarios fue uniforme a lo largo del país, variando en un rango entre 1.4 y 3 casos por 100.000 habitantes y año, excepto en una región en que fue de 15; en esta misma región, de 105 muestras de alimentos analizadas, 43.8% resultaron positivas a aflatoxinas, dato significativamente más alto que el de las otras regiones muestreadas. Asumiendo un consumo diario de 500 g de grano,

la ingestión de aflatoxina per capita en esta región podría situarse entre 0.02 y 2 mg diarios, cantidad que se sabe es hepatotóxica para los primates. En otra de las regiones, la contaminación por aflatoxinas también fue significativamente más alta que en el resto del país, pero sin embargo no sucedió lo mismo con los datos sobre incidencia de cáncer hepático, que se mantuvieron dentro de la media.

El mismo tipo de correlación entre contaminación por aflatoxinas en cacahuete y cáncer hepático se encontró en Swazilandia (Shank citado en 53). Este pequeño país presenta una muy alta incidencia de cáncer hepático, que se cifró en los años 1964-68 en 8.6 casos por cada 100.000 habitantes en varones y 1.6 cada 100.000 en mujeres. Se procedió a la realización de un estudio por Keen y Martin (citado en 395) para intentar correlacionar la presencia de aflatoxinas en cacahuete y la prevalencia de hepatoma primario en 4 áreas geográficas del país. De este estudio se dedujo que la incidencia de cáncer primario hepático resultaba estar correlacionada con el consumo de aflatoxinas en las distintas áreas del país, comprobándose en alguna de ellas que el 40% de las muestras analizadas contenía aflatoxinas. Asimismo, se observó que la incidencia de cáncer disminuía con la altitud a que se situaba la población, donde también disminuía la presencia de aflatoxinas en los alimentos, probablemente debido a que la climatología no era tan favorable para la síntesis de estas toxinas.

Estudios realizados en Kenia entre 1967 y 1970 correlacionan la incidencia de cáncer hepático y contaminación por aflatoxinas de los alimentos junto con la altitud; conforme se incrementa la altitud, y la temperatura va disminuyendo, el nivel de aflatoxinas en los alimentos disminuye también, así como la incidencia de cáncer hepático (Peers et al. citado en 53). En este estudio se recogieron muestras de orina de residentes en el distrito de Murang'a, en Kenia, donde la contaminación de los alimentos por aflatoxinas es muy común, encontrándose metabolitos de aflatoxinas en 6 de 81 muestras de orina. Asimismo, se encontró una correlación positiva entre ingestión diaria de B<sub>1</sub> e incidencia de cáncer hepático.

En otros estudios epidemiológicos realizados en Thailandia (Shank citado en 53) se obtuvieron asimismo correlaciones similares entre ingestión de aflatoxinas en la dieta e incidencia de cáncer hepático en diferentes regiones geográficas del país.

En Taiwan la incidencia de cáncer primario hepático es alta en relación a los valores alcanzados en Europa y Estados Unidos. Su clima es generalmente húmedo y caluroso, lo que favorece el enmohecimiento de los alimentos. Así se describió que muestras de arroz enmohecidas conteniendo aflatoxinas fueron la causa de la enfermedad de 25 personas. Esta descripción de Tung y Ling (citado en 395) ofrece una información muy sesgada del papel de las aflatoxinas en esa

alteración, aunque ha servido a distintos autores para indicar el enmohecimiento de los alimentos como un factor de la alta incidencia de cáncer hepático en Taiwan.

En Mozambique, de acuerdo con Purchase y Gonçalves (citado en 395) el cáncer hepático es bastante común en determinadas zonas del país, con unos valores aproximados en 1968 de 16 casos por 100.000 habitantes en varones y 1 a 2.1 en mujeres. Se llevó a cabo una toma de muestras de alimentos, y aunque el muestreo fue pequeño, hubo una mayor incidencia de muestras positivas a aflatoxinas en aquellas obtenidas en las familias de las víctimas de cáncer.

Van Rensburg et al. (citado en 395) indican los valores de cáncer hepático en una región de este país, indicando que son los más elevados del mundo, con 35.5 casos por 100.000 habitantes/año en 1964-68 y en 68-71 de 25.4/100.000/año. El análisis de aflatoxinas de 880 muestras de harinas reveló que el 9.3% contenían aflatoxinas. El nivel de contaminación medio fue de 7.8 µg/kg y el consumo per capita de 222.5 ng/Kg P.V. o 15.6 µg/adulto/día. Según estos datos parece ser que la incidencia de cáncer podría ser una función exponencial y estar linealmente relacionada con el logaritmo de la cantidad de aflatoxina ingerida.

En Filipinas, Campbell y Salamat (citado en 395) llevaron a cabo un estudio entre los años 1967 y 69 sobre la contaminación por aflatoxinas de los alimentos. Las muestras que contenían aflatoxinas presentaban una media de 155 µg/Kg.

Se recogieron 24 muestras de orina de personas que consumían mantequilla de cacahuete y todas contenían niveles detectables de aflatoxina  $M_1$ , calculándose que la ingestión mínima diaria de  $B_1$  para aparición de  $M_1$  en orina es de 15  $\mu g$ .

El estado nutritivo de los individuos expuestos a las aflatoxinas puede tener influencia sobre la respuesta orgánica a la toxina, ya que los 3 factores, malnutrición, consumo de aflatoxinas y alta incidencia de enfermedades hepáticas, incluyendo el cáncer, suelen presentarse con una correlación positiva en los grupos de población estudiados (53).

A este efecto, Madhavan et al. demostraron que si se reducía la ingestión de proteínas en la dieta suministrada a monos se incrementaba significativamente en éstos su susceptibilidad a las aflatoxinas. Newberne et al y Madhavan y Gopalan (citados en 53) efectuaron observaciones similares en un estudio realizado con ratas.

En los países desarrollados estos estudios son más problemáticos. Así, Hamilton (135) llevó a cabo un estudio retrospectivo en Estados Unidos, en el que comprobó que en el Sur rural se consumía más maíz y cacahuetes que en el Sur urbano, en el que a su vez se consumía más que en el Norte urbano (maíz y cacahuetes son los alimentos que presentan un mayor nivel de aflatoxinas en Estados Unidos). De los casos de cáncer registrados en esas zonas, se valoró concretamente





el cáncer hepático. Sorprendentemente, el Sur rural presentaba la incidencia más baja de cáncer hepático y el Norte Urbano la mayor. A la vista de estos resultados podría concluirse que las aflatoxinas tienen un efecto protector frente al cáncer hepático. Esto evidentemente no es cierto, y si es deducible es por la falta de datos.

En Estados Unidos, Stoloff y Friedman (citado en 269) estiman que los niños en comunidades rurales en el sur del país pueden llegar a ingerir 40 ng afl/Kg P.V. y día, principalmente con el maíz. Tal nivel produciría teóricamente de 4 a 10 muertes de cáncer primario hepático por 100.000 habitantes al año; la cifra real, sin embargo, es aproximadamente 1, que incluso es inferior al de otras regiones de Estados Unidos, tales como Wisconsin o California, donde las aflatoxinas teóricamente son ingeridas en cantidades insignificantes. Es decir, mostraron una correlación negativa entre exposición a aflatoxinas e incidencia de cáncer hepático.

En el caso de Estados Unidos, al igual que en los países desarrollados en general, no obstante debemos tener en cuenta factores tales como el alcoholismo o exposición a contaminantes industriales, que pueden enmascarar la acción tóxica de las aflatoxinas (348); también, como hemos indicado anteriormente, el virus de la hepatitis B.

Como otra problemática de la toxicidad de las aflatoxinas en

el hombre, Burg et al. y Sorenson et al. (citados en 342) han descrito la presencia de aflatoxinas en polvo respirable, a veces en concentraciones de mas de 100 ppb. Sorenson et al. (342) detectaron aflatoxinas en partículas de polvo de maíz y cacahuetes contaminados. Según estos mismos autores, el contenido en aflatoxinas del polvo es directamente proporcional a la contaminación por aflatoxinas de los productos almacenados. Como es lógico esperar, no se encontraron toxinas en el polvo de alimentos no contaminados. Este elevado contenido en aflatoxinas del polvo se puede explicar por la presencia de toxina en los conidios (142). Asi, Wicklow y Shotwell (393) en un estudio sobre el contenido en aflatoxinas de los conidios de 5 cepas de A.flavus y 4 cepas de A.parasiticus, todas ellas productoras de aflatoxinas, comprobaron que contenían una media de 153.000 ng/g y 27.600 ng/g de toxina total respectivamente.

En un estudio llevado a cabo en Holanda (Van Nieuwenhuize et al. citado en 53), se analizó un grupo de trabajadores expuestos a las aflatoxinas en el procesado del aceite de cacahuete. Los trabajadores expuestos presentaban 3 veces más cáncer que un grupo de trabajadores control, pero el número de trabajadores (60-70) fue demasiado pequeño como para que los resultados fueran estadísticamente significativos. Muestras del polvo recogido contenían de 1150 a 5260 ng/g con una media de 3850 ng/g en un lugar de la nave; y en otro de 281 a 4640 ng/g, con una media de 2550 ng/g. Dos muestras

recogidas durante el trasvase del alimento al camión contenían 1330 y 3000 ng/g respectivamente.

Existe otro estudio relacionando la exposición vía aerógena a aflatoxinas y la existencia de cáncer en trabajadores en una planta elaboradora de aceites de productos contaminados (139). Hubo 16 muertes por cáncer entre 1963-1980 de 71 hombres empleados en la planta entre 1961-1969, comparado con 7 muertes por cáncer en 67 hombres en el grupo control. Por tanto, el número de muertes por cáncer en el grupo de trabajadores expuestos a aflatoxinas fue más alto de lo esperado. No se detectó cáncer primario hepático en ninguno de los 2 grupos, pero en el grupo expuesto 2 hombres murieron de enfermedad hepática. 7 de los muertos del grupo expuesto presentaron tumores del aparato respiratorio, incluyendo 2 en lugares no habituales como son cavidad nasal y pleura.

En este contexto, Dvorackova (citado en 395) describió la aparición de carcinoma celular alveolar en un ingeniero químico de 68 años que había trabajado durante 3 meses en métodos de esterilización de harina de cacahuete contaminada con Aflavus. El análisis cromatográfico del tejido pulmonar demostró la existencia de una sustancia similar a la aflatoxina B<sub>1</sub>.

La Agencia Internacional para Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) clasifica las aflatoxinas como producto 2A, lo que significa que son probablemente carcinogénicas para el

- 115 -

hombre. Un reciente reportaje del Departamento de Salud y Servicios Humanos lista las aflatoxinas como uno de los 88 compuestos que producen cáncer en hombre, considerando a las personas que trabajan con este tipo de productos como población con un riesgo importante para el padecimiento de este tipo de procesos.

#### I.6. LEGISLACION SOBRE CONTENIDO DE AFLATOXINAS EN ALIMENTOS

Varios son los países que han incorporado en su legislación distintas Reglamentaciones sobre el contenido máximo de aflatoxinas tolerado tanto en alimentos para el ganado como en alimentos destinados al consumo humano.

En general, pueden distinguirse 2 posturas:

a/ Tolerancia Cero: Total ausencia de aflatoxinas en los alimentos. Debe tenerse en cuenta que esta Reglamentación se encuentra subordinada por el grado de sensibilidad que alcancen las técnicas analíticas. Son muy pocos los países que se acogen a este tipo de legislación.

b/ Precisar exactamente los límites máximos de aflatoxinas permitidos en un determinado alimento. Se puede llegar incluso al establecimiento de límites variables, o lo que se denomina como "nivel de acción"; esto es, el establecimiento de límites que varían según las necesidades del país en un momento dado.

Son varios los autores que consideran incorrecto el hablar de tolerancias cuando se trata de productos cancerígenos como es el caso de las aflatoxinas; para ellas, según estos autores, cualquier nivel detectable en un alimento debe ser

considerado potencialmente peligroso para el consumidor (19, 152, 191, 281).

La legislación en aflatoxinas más completa del mundo, y quizás la más exigente, es la de Suiza, que según ley número 817.024 de 14 de Septiembre de 1981 (91) establece el contenido máximo en aflatoxinas para distintos alimentos destinados al consumo humano, como son:

Alimentos para niños, incluido leche...10ng/Kg

Leche, leche en polvo, nata, suero de mantequería...50 ng/Kg

Mantequilla...20 ng/Kg

Queso....250 ng/Kg.

Esto se completa con unas rigurosas medidas para alimentos destinados al ganado, que incluye la prohibición del uso de harina de cacahuete para ganado lechero conteniendo aflatoxinas en niveles detectables (126).

A nivel de la Comunidad Económica Europea no existe una legislación específica sobre los niveles máximos de aflatoxinas admitidos en leche y productos lácteos, existiendo únicamente la limitación de 20 µg/Kg como máximo contenido en alimentos destinados al ganado lechero (372). Esto podría traducirse en un contenido de  $M_1$  en leche de 0.05 a 0.1 µg/L (262, 372).

Esta legislación a nivel comunitario a veces se encuentra complementada por los distintos países miembros pudiendo por parte de alguno de ellos adoptarse posturas más severas que permitan un mayor control de la presencia de aflatoxina en los alimentos del ganado lechero o en leche y productos lácteos directamente.

Así, por ejemplo Francia no permite el suministro de alimentos al ganado lechero con más de 20 ppb (122), en cuanto a alimentación humana únicamente establece una tasa máxima en alimentos dietéticos e infantiles situada en 5 µg/Kg (34, 118, 238).

En Holanda no se permiten cantidades superiores a 0.1 µg/l. de M<sub>1</sub> en leche y productos lácteos (323, 377).

La República Federal Alemana permite un contenido máximo de M<sub>1</sub> en leche de 0.05 ppb, y 0.01 ppb cuando se trata de leche para niños (296); con respecto a aflatoxinas en otros alimentos humanos, el máximo es 10 ppb (204).

Gran Bretaña tiene una legislación para alimentos del ganado lechero más restrictiva que la general de la CEE, establecida en 10 ppb.

En el caso particular de nuestro país no existe ningún tipo de legislación sobre alimentos humanos, aplicándose únicamente el nivel indicado para el caso del ganado lechero por la C.E.E. (60).

Una actitud curiosa a este respecto es la de los Estados Unidos. Debido a la imposibilidad de imponer un nivel cero, las autoridades americanas no han fijado tasa admisible ni autorizado contenido de aflatoxinas en alimentos. Existe una regla práctica, en la que se define lo que ellos llaman nivel de acción informal, que es el contenido de aflatoxinas ante el que las autoridades sanitarias intervienen. Este nivel de acción informal es periódicamente revisado en función del progreso de las medidas de análisis y de las posibilidades industriales. En alimentos para el ganado fué establecido en 1965 en 30 ppb; rebajado a 20 ppb en 1969; en 1971 se estableció en 5 ppb, quedando en este nivel únicamente 2 meses, al cabo de los cuales fue regulado de nuevo en 20 ppb; en 1975 se rebajó de nuevo, esta vez a 15 ppb. Un nivel de acción en leche fue establecido en 1978 en 0.5 ppb (71, 115, 191, 296, 351, 392).

En determinados países como Japón, Noruega, Suecia, etc, existen altas tolerancias para estas toxinas en alimentos para el ganado, que incluyen instrucciones detalladas sobre la máxima incorporación permitida de ingredientes sospechosos de contaminación durante la mezcla para la elaboración de alimentos compuestos (189).

También es posible la aplicación de una serie de medidas indirectas, como es el caso de las tomadas por Noruega y Dinamarca en el sentido de cerrar sus fronteras a la



importación de cacahuates y harina de los mismos (315).

Finalmente indicar que expertos de la O.M.S. han fijado el máximo tolerable en alimentos humanos en 30  $\mu\text{g/Kg}$  (64, 15), nivel que puede ser considerado excesivo para los países desarrollados, pero que resulta más real en países del tercer mundo, donde la problemática de las aflatoxinas debe convivir con el problema de la desnutrición y escasez de alimentos y donde el decomiso de alimentos no sigue un criterio tan estricto como en los países desarrollados.

#### I.7. PROBLEMÁTICA DE LAS AFLATOXINAS EN ESPAÑA

La legislación de nuestro país no especifica límites de aflatoxinas en alimentos humanos, ni para otras aflatoxinas distintas de la B<sub>1</sub>; únicamente señala límites máximos de B<sub>1</sub> permisible en piensos (36):

50 µg/Kg en piensos simples.

50 µg/Kg en piensos compuestos completos para rumiantes adultos con excepción de hembras lecheras.

20 µg/Kg en piensos para cerdos y aves adultas.

10 µg/Kg en otros piensos completos.

20 µg/Kg en piensos compuestos complementarios para hembras en lactación.

\* Con respecto a la presencia de aflatoxinas en leche y productos lácteos contamos con las investigaciones de Burdaspal et al. (60) y de Jodral (296, 300).

Burdaspal et al. (60) examinaron un total de 95 muestras de diferentes tipos de leche (natural, esterilizada, pasteurizada y concentrada), detectando en 7 de ellas (un 7.3%) aflatoxina M<sub>1</sub> en muy bajos niveles, de 0.02-0.04 µg/L; además, describen otras 10 muestras como dudosas, con un nivel probable de aflatoxinas inferior a 0.015 µg/L.

Jodral (161, 164) llevó a cabo un estudio de 1150 muestras de leche natural, 330 de leche esterilizada comercial y 77 de leche en polvo. En ninguno de estos 2 últimos casos detectó aflatoxinas. De las muestras de leche natural, describió un 15.2% de positivas en Invierno y 8.5% en Primavera. No detectó aflatoxinas en las muestras de Verano y Otoño.

\* Presencia de cepas aflatoxicogénicas en leche y productos lácteos:

Calvo et al. (68) llevaron a cabo un análisis de la flora fúngica de 50 muestras de quesos españoles, aislando A.flavus en el 52% de las mismas, un porcentaje muy elevado en relación con lo que sucede en otros países europeos. De 10 cepas de A.flavus, 5 resultaron ser tóxicas frente a Bacillus megaterium y 3 frente a Artemia salina. No efectuaron determinación de la capacidad de producción de aflatoxinas por esas cepas.

Vadillo (373) analizó 103 muestras de leche antes y después de ser sometida a un proceso de pasteurización baja en el laboratorio, y 40 muestras más antes y después de un proceso de pasteurización alta. De leche cruda aisló Aspergillus en un 11.65% de las muestras (10.52% en Invierno, 12.12% en Primavera, 11.76% en Verano y 9.09% en Otoño). A partir de leche pasteurizada 63°C-30 min. obtiene el mismo porcentaje de Aspergillus: en un 11.65% de las muestras (5.26% en Invierno, 12.12% en Primavera, 17.64% en Verano y 13.63% en

Otoño). Refiriéndonos al caso concreto de A.flavus, aisló 21 cepas de leche cruda y 12 de leche pasteurizada 63°C-30 min. De todas ellas, únicamente 1 cepa resultó ser positiva a la producción de aflatoxinas sobre un medio de trigo machacado y humedecido.

Mateos (222) investigó la flora fúngica de 473 muestras de yogur de distintos tipos. Hongos pertenecientes al Género Aspergillus fueron detectados en un 4% de las muestras. 5 de las cepas aisladas de A.flavus resultaron ser aflatoxicogénicas al ser sembradas sobre un medio de trigo machacado y humedecido.

\* Con respecto a otros alimentos humanos, Guergue y Ramirez (133) llevaron a cabo la determinación de la flora fúngica de especias contaminadas. Aislaron un 19% de Aspergillus flavus, 66% de los cuales producían B<sub>1</sub> y 33% G<sub>1</sub>. Dentro de estas mismas investigaciones, demostraron la capacidad de producción de aflatoxinas sobre salchichas, quedando las toxinas únicamente en la capa externa, no profundizando hasta capas internas.

Jodral (163) investigó 49 muestras de aceite de origen vegetal (aceite de girasol refinado, aceite de oliva sin refinar y refinado, soja, germen de maíz). Únicamente 2 muestras presentaron trazas de las 4 aflatoxinas principales, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>, y una muestra más presentaba trazas de B<sub>1</sub> y

G<sub>1</sub>.

Burdaspal y Pinilla (61) de Junio del 77 a Abril del 80, examinaron 320 muestras de alimentos infantiles (202 papillas y 118 potitos), no detectando aflatoxinas en ninguna de las muestras.

Cutuli (82) analizó 200 muestras de pan, productos de bollería y harinas lacteadas para uso infantil. Detectó aflatoxinas en 2 muestras, una de croissant y otra de harinas lacteadas infantiles. Dentro de estos estudios, llegó a aislar una cepa de A.flavus y otra de A.parasiticus productoras de aflatoxinas.

Calvo et al. (67) aislaron cepas fúngicas del 88% de las muestras de foie-gras investigadas. 48% de estas cepas resultaron ser activas sobre Staphylococcus aureus, 256% frente a Bacillus subtilis, 33% sobre Escherichia coli y 10% sobre Candida albicans.

Palacios y Avenosa (252) inocularon con A.parasiticus bases de racimos frescos, y detectaron aflatoxinas después el proceso de fabricación del vino, demostrando por tanto la no degradación de las aflatoxinas a lo largo del mismo.

Falomes et al. (253) analizaron 139 muestras de alimentos, entre los que incluyeron almendras, avellanas, cacahuetes, nueces, pan de molde, galletas y cereales: en 79 muestras

investigaron micotoxinas, y en 60 además su microflora y presencia de hongos micotoxigenicos. Detectaron A.flavus en el 70% de las muestras, un valor considerablemente elevado. De más de 200 cepas de A.flavus que fueron aisladas, unicamente el 10% presentaba poder aflatoxicogenico. No detectaron aflatoxinas en ninguna de las muestras.

\* Con respecto a alimentos para animales, Quintanilla (285) aisló de maíz 101 cepas de A.flavus de un total de 275 cepas de Aspergillus : ésto significa un elevado porcentaje del 39% de las cepas del género, y un 18% del total de las aisladas. De ellas, un 31% resultaron ser tóxicas frente a larvas de Artemia salina .

Este mismo autor (286) aisló de 380 muestras de cebada, 55 cepas de A.flavus de un total de 411 cepas. De ellas, 9 producían aflatoxinas B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub>, 16 presentaban productos de fluorescencia verde intensa y 30 no producían nada detectable por CCF. Analizó para aflatoxinas 125 muestras de cebada. siendo todas ellas negativas, aunque 27 se encontraban contaminadas con diferentes micotoxinas. Debe resaltarse que todas estas muestras presentaban un aspecto normal, no enmohecido.

Sanchis et al. (306) analizaron 31 muestras de maíz importado, de las que en 29 se detectaron aflatoxinas, un

porcentaje muy elevado. Más del 80% de las muestras presentaban una concentración de aflatoxinas superior a 20 µg/Kg. Por otra parte, aislaron A.flavus del 100% de las muestras.

Asimismo, analizaron 120 muestras de maíz (308), de las que el 10% se encontraban contaminadas con aflatoxinas en una proporción inferior a 20 µg/Kg. La incidencia de A.flavus resultó ser del 22% de las muestras. De 37 cepas, el 40% presentaban la capacidad de producir aflatoxinas.

Analizaron también la flora fúngica de 32 muestras de maíz importado (307). Obtuvieron que 48 de 98 cepas de A.flavus eran tóxicas para Artemia salina, mientras que en A.parasiticus presentaban esta capacidad 21 de 39.

Santamarina et al. (313) investigaron 60 muestras de cacahuetes, encontrando contaminación por aflatoxinas en el 7% de las mismas en un nivel que llegó a ser de 5 ppm en dos muestras. 88% de las muestras presentaban A.flavus. De 180 cepas aisladas de este hongo, el 30.6% resultaron ser toxicogénicas.

Anadón y Carballo (9) aislaron de trigo 7 cepas de A.flavus, y de maíz 3 de A.flavus y 2 de A.parasiticus. De todas ellas, 2 de A.flavus resultaron ser productoras de aflatoxinas.

Sanchis et al. (309) aislaron 137 cepas de A.flavus a partir de maíz, 37 de las cuales eran productoras de

aflatoxinas.

Sala et al. (304) investigaron 50 muestras de maíz, cebada, sorgo y trigo. A.flavus apareció en el 37% de las mismas, siendo el hongo más abundante de todos los aislados. El 20% de estas cepas resultaron ser productoras de aflatoxinas. Ninguna de las muestras apareció contaminada por aflatoxinas.

Santamarina et al. (312) aislaron de 50 muestras de arroz un porcentaje de A.flavus inferior al 10%

Moreno (239) aisló Aspergillus del 68.6% de las muestras de pienso en gránulo para Broilers, del 93.6% en harina para broilers, y del 81.1% en harina para ponedoras. A.flavus apareció en 42.9% de gránulo Broilers, 80.6% en harina broilers, 67.9% en harina ponedoras. En total son 125 cepas de A.flavus y 1 de A.parasiticus. Dentro de estas investigaciones, 148 muestras de pienso fueron negativas a la presencia de aflatoxinas.

De todos estos estudios efectuados en nuestro país, cabe destacar el elevado porcentaje en que A.flavus ha sido aislado de distintos alimentos, tanto humanos como animales, con valores muy superiores a los descritos por otros autores, fundamentalmente europeos.



#### 1.8. OBJETIVOS E INTERES DEL TRABAJO

A lo largo de los distintos capítulos de la Introducción del presente Trabajo de Tesis Doctoral hemos ido apuntando alguno de los aspectos que presenta la contaminación de los productos lácteos por las aflatoxinas, y el riesgo que ello implica para el consumidor.

Nos planteamos el presente trabajo de investigación como un avance en el conocimiento de la problemática que presentan las aflatoxinas en dos productos lácteos fermentados de amplio consumo en nuestro país, el yogur y el queso Madurado.

Para poder llegar a profundizar en estos estudios, inicialmente nos surgió la necesidad de contar con una técnica analítica que resultara satisfactoria en cuanto a nuestros requerimientos, fundamentalmente en cuanto a límite de sensibilidad y grado de recuperación de las mismas se refiere. Además, queríamos hacer hincapié en otro aspecto que no había sido objeto de atención por otros autores; hasta ese momento, las distintas técnicas de análisis de aflatoxina en leche y productos lácteos iban dirigidas fundamentalmente hacia la aflatoxina  $M_1$ , y por tanto, hacia su presencia en niveles mínimos en el sustrato estudiado, lo que se traducía en técnicas lentas para conseguir una limpieza suficiente del extracto final, normalmente cloroformico; a nosotros nos

preocupaba un nuevo aspecto, que era el hecho de que en el estudio de la producción experimental de aflatoxinas sobre productos lácteos por cepas aflatoxicogénicas, el nivel de estas toxinas no es tan bajo como en lo que se refiere a la presencia de aflatoxina M<sub>1</sub>, con lo que un límite de sensibilidad de 0.1 ppb es considerado más que suficiente; por otro lado, la necesidad de analizar un número considerable de muestras inoculadas hacía necesario que la técnica a emplear cumpliera unos requisitos básicos de rapidez y economía.

En segundo lugar, nuestras investigaciones, tanto en yogur como en queso Madurado, incluirían un doble propósito:

- 1) Por una parte, la contaminación directa de estos substratos por cepas aflatoxicogénicas, que al desarrollarse sobre ellos darían lugar a la producción de aflatoxinas.

- 2) Por otra, la presencia de aflatoxinas en la leche a partir de la cual se elaborarían estos productos lácteos como consecuencia de la ingestión de alimentos contaminados con aflatoxinas por el animal productor de la leche.

A/ YOGUR: La utilización del yogur como objeto de nuestros estudios vino determinada fundamentalmente por el hecho de que se discutía por ciertos autores la capacidad de producción de aflatoxinas sobre este substrato,

fundamentalmente debido a que su principal fuente de hidratos de carbono está constituida por lactosa, según algunos autores no muy favorable para la producción de aflatoxinas, y por otra a que su pH no parece ser muy favorable para la síntesis de estas toxinas, así como el efecto inhibitor directo de la flora láctica sobre el metabolismo secundario del hongo.

Nosotros hemos pretendido estudiar detenidamente los distintos aspectos que presenta la producción de aflatoxinas en yogur, y que abarcan:

- Influencia que el proceso de elaboración del yogur pudiera tener sobre los hongos aflatoxicogénicos, incluyendo dentro de esta influencia no solo la elevada temperatura de elaboración de este producto (45°C), sino también el probable efecto de las bacterias lácticas. Para esto utilizaríamos como sustratos por una parte yogures comerciales y por otra yogures elaborados por nosotros.

- Influencia de la temperatura de incubación sobre la producción de aflatoxinas en yogur, fundamentalmente encaminada a determinar la temperatura mínima a que es posible dicha producción.

- Importancia de la integridad del envase y de las roturas que pudieran influir en la aireación del producto.

- Periodo de incubación necesario para la producción de aflatoxinas sobre este sustrato.

- Influencia de la forma y del momento en que puede producirse la contaminación por cepas aflatoxicogénicas.

- Influencia que las diferentes tecnologías de elaboración tienen sobre la producción de aflatoxinas. En las Industrias Elaboradoras, se utiliza normalmente el envasado y sellado del producto una vez mezclados los distintos componentes y antes de llevar a cabo la fermentación. En cambio, el yogur casero es elaborado en envases no cerrados. También se debe tener en cuenta que otras veces se utilizan tanques de fermentación continua, envasándose el yogur después del proceso de fermentación.

- En cuanto a los estudios referentes a los hongos aflatoxicogénicos ha sido nuestra intención incluir la influencia de la cepa utilizada por una parte y la influencia que el tamaño del inóculo tendría.

Por otra parte fué nuestra intención seguir los pasos de lo que sucedería en el caso de que la leche utilizada en la elaboración del yogur se encontrara contaminada con aflatoxina  $M_1$ . Nos propusimos efectuar el seguimiento de la toxina a lo largo de la elaboración, así como durante el periodo de almacenamiento del producto hasta cumplir el

periodo de caducidad.

B) Queso Madurado: Al igual que en el caso del yogur, nos propusimos estudiar los distintos factores que podrían influir sobre la producción de aflatoxinas en este producto lácteo, para lo cual llevamos a cabo los siguientes estudios:

- Inoculación de la leche original, a partir de la cual se elaboraría el queso, con una suspensión de esporas del hongo aflatoxicogénico. De esta forma se simulaba una contaminación proveniente de la leche, y antes de que el queso fuera elaborado. Junto con los estudios de producción de aflatoxinas, podríamos comprobar el camino que esas esporas seguirían durante dicho proceso de elaboración.

- Inoculación en la superficie del queso: En este caso se suponía que la contaminación se producía en la sala de madurado del queso. Estos estudios serían completados con otros en el sentido de llevar a cabo la inoculación en el centro del queso, con objeto de comprobar si en el interior del mismo sería posible el desarrollo de hongos aflatoxicogénicos.

- Inoculación de porciones de queso: De esta forma estudiábamos la posible importancia que podría tener la corteza del queso como defensa frente al desarrollo de hongos aflatoxicogénicos.

- Inoculaciones en queso triturado: Pretendíamos comparar la influencia que el grado de desmenuzamiento del queso tendría sobre la producción de aflatoxinas. Estos estudios se completaron con la elaboración de una pasta de queso, donde comprobaríamos la influencia que el contenido en agua podría desarrollar en la producción de aflatoxinas en queso Madurado, así como comprobar si este queso constituye un substrato adecuado para la producción de estas toxinas.

De forma paralela a lo efectuado en el yogur, se procedería a estudiar la posibilidad de contaminación indirecta por aflatoxinas en el queso Madurado. Nuestros estudios abarcaron un seguimiento de lo que sucedía con las aflatoxinas a lo largo del proceso de elaboración del queso, madurado, almacenamiento en refrigeración y almacenamiento en congelación, teniendo en cuenta asimismo la influencia que la presencia de aflatoxinas pudiera tener sobre las bacterias presentes en leche así como las que constituyen el starter. Debemos considerar que la idea de la realización de los estudios de la incidencia del almacenamiento en congelación venían determinados, más que por el hecho de tratarse de una práctica comercial, por ser costumbre en muchos laboratorios del mundo el almacenamiento en estas condiciones de las muestras antes de proceder a su análisis en busca de aflatoxinas.

Una vez iniciado nuestro trabajo de investigación, y basándonos en el hecho de haber descrito una técnica de elevada sensibilidad, nos propusimos el efectuar un pequeño seguimiento de la presencia de aflatoxina M<sub>1</sub> en leches españolas. Debemos resaltar que no pretendíamos hacer un estudio profundo de cuál era la situación de nuestro país a este respecto, sino más bien un pequeño "screening", que sirviera de índice de lo que podría ser la situación actual, y asimismo sirviera para comparar con la situación en otros países, fundamentalmente de la Comunidad Económica Europea.

Por ésto elegimos una zona húmeda, como es la parte norte de la provincia de León, donde en teoría la contaminación por aflatoxinas de los alimentos del ganado sería mas fácil de producirse, y consiguientemente su aparición en la leche.

II. MATERIAL  
Y  
METODOS



## II.1. MATERIAL

### II.1.a. Aflatoxinas:

\* Aflatoxinas patrón:  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$ ,  $G_2$ , suministradas en viales de 1 mg, y  $M_1$  en viales de 0.01 mg (SIGMA, USA, y SERVA, RFA).

\* Soluciones de trabajo: A partir de los patrones se elaboraron las siguientes soluciones de trabajo utilizando cloroformo como solvente:

•Aflatoxina  $B_1 + B_2 + G_1 + G_2$ : 5  $\mu\text{g/ml}$  y 0.1  $\mu\text{g/ml}$  de cada una de las aflatoxinas.

•Aflatoxina  $M_1$ : 1  $\mu\text{g/ml}$  y 0.1  $\mu\text{g/ml}$ .

### II.1.b. Aparatos:

- Centrífuga Sorvall RC-5B Refrigerada con rotor GSA.
- Rotavapor Heidolph Selecta tipo VV-1.
- Baño Univeba-401, regulable entre 0 y 220 °C.
- Bomba de agua para la obtención de vacío.
- Estufa Heraeus, regulable entre 0 y 250 °C.
- Secador de cabello Braun.
- Cámara de extracción de gases.
- Lámpara de luz ultravioleta Camag Standard nº 29200, con

luz UV de 366nm Sylvania FBTS/BLB y de 254nm Sylvania Germicidal GBTS.

- Agitador de vaivén Heron.
- Homogeneizador de brazo vertical Braun modelo Vario.
- Bomba de vacío General Electric A-C motor n°1276.
- Balanza monoplato modelo Sartorius 1265 MF.
- Estufas de cultivo a distintas temperaturas.
- Quemador de gas butano.
- Cámara de refrigeración a 4°C.
- Arco congelador de -20°C.
- Agitadores excéntricos.
- Cámara de Thoma para recuentos sanguíneos.
- pHímetro Crison 414.

#### II.1.c. Material de vidrio:

##### • Pipetas:

Pasteur.

Pipetas graduadas de 1 y 10 ml.

Pipetas volumétricas de 25 ml.

• Probetas de 30, 50, 100, 125, 500 y 1000 ml.

• Embudos de decantación cónicos de 250 y 500 ml, con llave de Teflon y tapón de polietileno.

• Embudos de vástago corto.

• Matraces erlenmeyer de 100, 250, 500 y 1000 ml.

• Matraces en forma de pera de 500 ml especiales para rotavapor.

- Tubos para centrifuga, cónicos, graduados de 0 a 10 ml en 1/10, con 10 ml de capacidad.

- Columnas para cromatografía con llave de vidrio y placa porosa soldada del nº 0:

  - Con diámetro interior de 10 mm y altura útil de 20 cm.

  - Con diámetro interior de 20 mm y altura útil de 40 cm.

- Miniviales de color ámbar, tapón de rosca y cierre de teflon, de 5 y 10 ml.

- Placas de Petri de vidrio de 9 y 15 cm de diámetro.

- Termómetros Proton de distinto calibrado.

#### II.1.d. Material para Cromatografía en Capa Fina (CCF):

- Microjeringa Hamilton Bonaduz Schweiz modelo 700, de 50 µl.

- Dispensador repetitivo Hamilton, adaptable a las microjeringas.

- Feine trazador divisor de placas Applied Science.

- Cromatoplasmas de Silica Gel 60, sin indicador de fluorescencia, de 20 x 20 cm y espesor de capa de 0.25 mm, Merck.

- Bastidor de cromatoplasmas Desaga.

- Desecador de vidrio Desaga, con Sílica gel como agente desecante.

- Cámaras de desarrollo cromatográfico Desaga nº120167.

- Pulverizadores cromatográficos Desaga 124010.

II.1.e. Otros materiales:

- Vasos de centrífuga de acero de 285 ml de capacidad, específicos para el rotor GSA Sorvall.
- Pera de goma para llenado de pipetas.
- Soporte pie de plato con varilla de acero inoxidable para soporte de los embudos de decantación.
- Papel de filtro Albet 238 de 12 cm de diámetro.
- Tapones de goma para matraces erlenmeyer.
- Pinzas Minimax Selecta S-404.
- Jeringas estériles de un solo uso de cono Luer de 5 y 10 ml.
- Agujas estériles Yale de 0.6 x 25 mm de cono Luer.
- Parafilm.
- Papel Colhogar.

II.1.f. Reactivos: Grado analítico o equivalente:

- Cloroformo.
- Metanol.
- Acetona.
- Tolueno.
- Acido acético.
- Hexano.
- Eter.
- Acetonitrilo.

- 140 -

- Isopropanol.
- Acido trifluoroacético.
- Sulfato sódico anhidro.
- Bicarbonato sódico.
- Cloruro sódico.
- Celite.
- Alúmina.
- Acido sulfúrico: Se prepara una solución de ácido sulfúrico en agua al 1/3, por incorporación del ácido al agua de forma lenta.
- Solución de sulfato sódico saturado: Se disuelven 130 g de sulfato sódico en 500 ml de agua.
- Solución de acetato de plomo al 10%: Se disuelve en caliente 100 g de  $(\text{AcO})_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  en 500 ml de agua. Se añaden 3 ml de ácido acético al 100%; Se deja enfriar y se completa hasta 1 L.
- Sílica Gel 60 7734 Merck.

#### II.1.g. Medios de cultivo:

- \* Agua de peptona al 1% con Tween 80.

##### Composición:

Bactopeptona (Difco).....	10.0 g
Tween 80.....	1 ml
Agua destilada.....	1000 ml

Preparación: Tras disolver las cantidades precisas

se distribuye en tubos a razón de 9 ml en cada uno, que son esterilizados a 121°C durante 15 minutos.

\* Medio de recuento propuesto por Núñez (1980).

Composición:

Glucosa.....	5.0 g
Bactopeptona (Difco).....	5.0 g
Extracto de Levadura (Oxoid)..	5.0 g
Extracto de carne (Oxoid).....	5.0 g
Fosfato disódico.....	2.0 g
Agar (Oxoid).....	10 g

Preparación: Tras pesar los componentes, se disuelven en 1000 ml de agua destilada, procediendo a ajustar el pH a 7.0, para esterilizar a continuación en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

\* Agar patata dextrosa (Oxoid).

Composición:

Extracto de patata.....	4.0 g
Dextrosa.....	20.0 g
Agar .....	15.0 g

Preparación: Se disuelven estas cantidades en 1000 ml de agua destilada, esterilizando en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

\* Solución Ringer al 1/4 con Tween 80.

Composición:

Cloruro sódico.....	9.0 g
Cloruro potásico.....	0.42 g
Cloruro cálcico.....	0.48 g
Bicarbonato sódico.....	0.20 g
Tween 80.....	0.5-1 ml
Agua destilada.....	4000 ml

Preparación: se disuelven perfectamente los componentes en el agua destilada y parte de la solución se distribuye en tubos a razón de 9 ml en cada uno. Se esteriliza a 121°C durante 15 minutos.

\* Medio para estudio de la capacidad de producción de aflatoxinas (Aflatoxin producing Ability Medium, AFA), Hara. 1974.

Composición:

Fosfato monoamónico.....	10.0 g
Fosfato bipotásico.....	1.0 g
Sulfato de magnesio heptahidratado.	0.5 g
Cloruro potásico.....	0.5 g
Sulfato ferroso heptahidratado....	0.01 g
Sacarosa.....	30.0 g
Cloruro de mercurio.....	0.136 g
Corn steep liquor.....	0.5 g
Agar.....	20.0 g
Agua destilada.....	1000 ml

Preparación: Se disuelven por una parte las sales de mercurio, hierro y magnesio, y por otra los demás componentes salvo el agar; de esta forma se evita la aparición de precipitados de difícil solubilización que se forman al disolver conjuntamente todos los ingredientes. Una vez que se encuentran perfectamente disueltas, se unen ambas fracciones y se ajusta el pH a 5.5 con hidróxido sódico 1N. Se añade el agar, se calienta hasta ebullición para su completa disolución y se distribuye en tubos a razón de 25 ml en cada uno. Estos tubos se llevan a esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

Una vez estéril, el contenido de cada tubo se vierte sobre placas de Petri de vidrio estériles de 9 cm de diámetro, y se deja solidificar; de esta forma, todas las placas contienen la misma cantidad de medio de cultivo.

\* Medio de trigo machacado y humedecido.

Composición:

Trigo ligeramente triturado.... 50 g

Agua destilada..... 50 ml

Preparación: Se pone el trigo en placas de vidrio de 14 cm de diámetro; se añade el agua, igualando la superficie del medio con la ayuda de la parte inferior de la probeta utilizada para incorporar el agua. Se esteriliza a 121°C durante 15 minutos.



II.1.h. Material utilizado para la fabricación del queso  
Madurado:

\* Leche: Suministrada por la empresa "Central Quesera S.A.", procedente de diversas regiones españolas. Se trataba de leche de mezcla en las proporciones:

especie ovina.....	15%
especie caprina.....	35%
especie bovina.....	50%

Las características físico-químicas de la leche empleada fueron analizadas por un aparato MilkoScan (203 B), encontrándose unos valores para los distintos lotes de leche utilizados que se situaban entre los siguientes márgenes:

materia grasa.....	4.30 - 4.33 %
proteína.....	3.62 - 3.71 %
lactosa.....	4.36 - 4.40 %
extracto seco total....	12.85- 13.06 %

\* Pasterizador de placas (APV) con capacidad para 25000 L, donde la leche era pasterizada a 72°C durante 15 segundos.

\* Cloruro cálcico (Merck).

\* Cultivo láctico "starter": comercializado por Chr.

Hansen (Copenhague, Dinamarca), expandido en forma de polvo de cultivo liofilizado, para preparación del cultivo madre (Dri-Vac). El cultivo empleado por nosotros (CH-N 01) presentaba las siguientes características:

células viables por gramo....  $1-2 \times 10^9$

tipo de cultivo..... BD (DL)

composición del cultivo reactivado:

1-5 % Streptococcus lactis

75-80 % St. cremoris

10-15 % St. diacetylactis

5-10 % Leuconostoc cremoris

Producción de aroma..... alta

Producción de  $CO_2$ ..... alta

Proteólisis..... media

Tolerancia a la sal

máximo desarrollo..... 4.0 % ClNa

inhibición del desarrollo..6.5 % ClNa

En una primera etapa se procedía a suspender el contenido de un sobre del producto liofilizado en 1500 ml de leche esterilizada, incubando después a 22 °C durante 24 h, tras las cuales se distribuyó en alícuotas de 50 ml que fueron congeladas a -20 °C. Para la fabricación de cada uno de los lotes de queso se descongelaba una de estas alícuotas y se agregaba a 750 ml de leche esterilizada, incubando igualmente a 22 °C durante 22-26 h.

\* Cuajo (Chr. Hansen) de fuerza 1:100.000. Para su preparación se disolvía la cantidad requerida en 20 ml de agua destilada estéril, y se añadía inmediatamente a la leche.

\* Lira: Para cortar la cuajada se empleó una lira fabricada con madera de pino de sección cuadrada de 22 mm de lado, y alambre especial para este instrumento. Su longitud total fue de 30 cm y la distancia entre los alambres de 1 cm.

\* Moldes: Se utilizaron moldes cilíndricos de plástico de 2 dimensiones diferentes:

- Grandes:

diámetro externo.....184 mm

diámetro interno.....167 mm

altura interior.....115 mm

altura exterior.....123 mm

Dotados de una pieza interior extraíble, igualmente de plástico, de 65 mm de espesor, en forma de cilindro no continuo para un perfecto ajuste dentro del molde.

Tapa:

diámetro.....150 mm

sección..... 13 mm

- Pequeños:

diámetro exterior....144 mm

diámetro interior....127 mm

- 147 -

altura exterior..... 93 mm

altura interior..... 85 mm

Tapa:

diámetro.....124 mm

sección..... 12 mm

Ambos tipos de moldes estaban provistos de orificios tanto en su fondo como en las paredes laterales para facilitar el desuerado. Las tapas disponían asimismo de unos apéndices cilíndricos huecos para posibilitar la retirada de las mismas y la distribución de las presiones.

\* Cheesecloth: manufacturados en lino, cuadrados, de 55 cm de lado.

\* Solución de salmuera: de 25 grados Beaumé.

\* Cucharón de latón de 60 cm de largo.

\* Colador grande de cocina de aluminio, con forma cónica y orificios de un diámetro aproximado de 1.2 mm.

\* Recipientes de plástico de 25 L de capacidad, en forma de cono truncado con las medidas siguientes:

altura..... 30 cm

diámetro superior..... 38 cm

diámetro inferior..... 30 cm

- 148 -

\* Baños de agua de flujo continuo (SELECTA) de temperatura regulable.

## II.2. LUGAR DE TRABAJO

La totalidad de las investigaciones que constituyen este Trabajo de Tesis Doctoral han sido llevadas a cabo en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

## II.3. PRECAUCIONES EN EL MANEJO DE LAS AFLATOXINAS

Dadas las características tóxicas de las aflatoxinas, especialmente en lo referido a su carcinogenicidad, con las implicaciones que esto podría tener en el personal de laboratorio en contacto con dichas toxinas, era necesario tomar una serie de precauciones para el manejo de las mismas en el curso de nuestros estudios. Estas medidas precautorias fueron ya establecidas en el inicio de las investigaciones sobre aflatoxinas en los años 60 por diversos autores (72, 111, 129, 305, 349), y son norma usual en los laboratorios de todo el mundo dedicados a la investigación sobre aflatoxinas.

- Siempre que eran manejados en el laboratorio productos contaminados con aflatoxinas, ya fueran medios de cultivo, soluciones patrón, substratos en estudio, etc, así como en

los estudios con hongos aflatoxicogénicos, tomábamos la precaución de cubrir nuestras manos con guantes de un solo uso, que se completaba con la utilización de una mascarilla con filtro para compuestos orgánicos marca Vispro.

- Antes de proceder a la limpieza de los distintos materiales de trabajo (matraces, tubos, pipetas, etc...) que habían estado en contacto con aflatoxinas, eran sumergidos en una solución de lejía casera (5-6% de hipoclorito sódico) al 10%, es decir, con un contenido del 0.5% en hipoclorito. Dichos materiales se introducían en esa solución durante al menos 10 minutos.

- Los miniviales donde se mantenían los extractos de las muestras, en algunos casos con una alta proporción de toxinas, eran detoxificados por la aplicación a su interior de lejía casera pura.

- La mesa de trabajo habitual era limpiada al final de la jornada con una toalla de papel humedecida en una solución de lejía casera disuelta al 10%.

- En aquellos casos en que se vertió material tóxico sobre la mesa de trabajo, se cubría la zona contaminada con una toalla de papel sobre la que se añadía lejía pura para que embebiera bien toda la zona, dejando que actuara durante al menos media hora. Una vez transcurrido este tiempo, se limpiaba la mesa con una solución detergente.

#### II.4. CEPAS AFLATOXICOGENICAS DE COLECCION

Para llevar a cabo nuestros estudios de producción de aflatoxinas sobre distintos productos lácteos utilizamos principalmente la cepa Aspergillus parasiticus NRRL 2999. Para nuestras investigaciones acerca de la posible influencia de la cepa sobre la producción de aflatoxinas en yogur utilizamos también la A.flavus NRRL 3251.

De estas cepas se hacía una resiembra en tres puntos en una placa de Petri con Agar Patata Dextrosa, manteniéndose 7 días a 25 °C, y posteriormente a 4 °C hasta que se procedía a realizar la inoculación. Nunca se utilizaron placas que hubieran estado en refrigeración por un periodo de tiempo superior a 16 días.

Para llevar a cabo la inoculación se utilizaron 2 procedimientos:

a/ Suspensión de esporas: La placa de Agar Patata con la cepa crecida se inundaba con 9 ml de una solución Ringer al 1/4 con Tween 80; se aplicaban movimientos circulares a la placa para conseguir la suspensión de las esporas en la solución Ringer, que era posteriormente recogida con la ayuda de una jeringa estéril de 10 ml, y pasada a un tubo estéril. Se homogeneizaba el contenido del tubo con la ayuda de un agitador excéntrico. Se tomaba una pequeña cantidad mediante la utilización de una jeringa estéril de 5 ml con su



correspondiente aguja, y se procedía a realizar el conteo del número de esporas, para lo cual se colocaba una pequeña cantidad de la solución en una cámara de Thoma para recuentos sanguíneos, en la cual se establecía el número de esporas por ml de solución Ringer.

b/ Asa cargada: De dicha placa, con la ayuda de un asa de platino, se recogen micelio y esporas.

Para solventar la posible pérdida de capacidad aflatoxicogénica de las cepas estudiadas por sucesivos pases por medios sintéticos, de forma periódica se sembraban estas cepas en un medio natural de alta producción de aflatoxinas, como es el medio de trigo machacado y humedecido.

Asimismo, para comprobar que dicha capacidad no se hubiera perdido, se procedía a la siembra en un medio de detección de la capacidad aflatoxicogénica por fluorescencia del mismo, como es el medio APA (Aflatoxin producing ability medium).

## II.5. TECNICAS DE DETERMINACION DE AFLATOXINAS EN LECHE Y PRODUCTOS LACTEOS

### II.5.a. Introducción

Una vez planteado el trabajo de investigación a desarrollar, nuestro primer objetivo debía ir dirigido a encontrar una técnica de determinación de aflatoxinas que permitiera un bajo límite de detección y una repetitividad de resultados que la hicieran fiable; asimismo, dado el amplio número de muestras a analizar dentro de los distintos apartados de que consta el presente estudio, esa técnica debía poseer la característica fundamental de fácil y rápido desarrollo, y por supuesto, que se adaptara a las características materiales de nuestro laboratorio, apto para una metodología de Cromatografía en Capa Fina (CCF).

En el presente capítulo describiremos las distintas técnicas que fueron investigadas por nosotros en un principio para calibrar su posible utilidad en nuestros estudios: Lafont et al. (193), Tripet et al. (368), Stubblefield (353). Por una u otra causa, y como expondremos en otros capítulos venideros, ninguna de ellas satisfacía plenamente nuestras necesidades, por lo que trabajamos para desarrollar una nueva técnica de análisis de aflatoxinas en leche y productos lácteos que describiremos como técnica propia.

Esta Técnica descrita por nosotros presenta 2 variantes:

\* TECNICA I: Incorpora un proceso de limpieza del extracto en columna cromatográfica, consiguiéndose una sensibilidad que permite el análisis de leche con un bajo límite de detección (0.02 ppb), que la hacen idónea para el seguimiento epidemiológico de la presencia de aflatoxina M<sub>1</sub> en muestras de leche comercial.

\* TECNICA II: No precisa de limpieza en columna, con un límite de detección de 0.1 ppb en leche, y una rapidez en cuanto a su ejecución que la hacen idónea para el análisis de un gran número de muestras en un corto intervalo de tiempo.

En el presente capítulo expondremos en primer lugar la Técnica I, variedad de la metodología descrita por nosotros que es utilizable para la investigación de productos lácteos con bajo nivel de contaminación; en el presente estudio, fue utilizada en el seguimiento de M<sub>1</sub> en muestras de leche. A continuación, describiremos las técnicas de otros autores que fueron probadas para la determinación de aflatoxinas en leche. Finalmente, describiremos nuestra variante Técnica II, como útil en el análisis rápido de muestras de productos lácteos con un nivel de contaminación con aflatoxinas superior a 0.5 ppb; fue utilizada en el análisis de yogur y queso inoculados con cepas toxicogénicas.

Por otra parte, debemos hacer constar que la metodología descrita por los distintos autores está ligeramente variada para adaptarla a las características de nuestro laboratorio, sin afectar de forma fundamental el desarrollo de la misma.

#### II.5.b. Muestra patrón

El primer paso en nuestras investigaciones debía ser la elección de la Técnica Analítica que posteriormente sería utilizada por nosotros. Para ésto comparamos distintas técnicas utilizando una muestra patrón de leche, contaminada en todos los casos con la misma proporción de aflatoxina M<sub>1</sub>.

La muestra original estaba constituida por 50 ml de leche esterilizada comercial que era contaminada con una solución patrón de aflatoxina M<sub>1</sub> hasta un nivel de 0.5 µg/l, o lo que es lo mismo, 0.5 ppb. La aflatoxina patrón se encontraba en una solución en cloroformo en la proporción de 1 µg/ml, por tanto para poder alcanzar los niveles citados, a los 50 ml de leche se deben añadir 25 µl de dicha solución con la ayuda de una microjeringa con dispensador repetitivo de 1 µl. Esos pequeños restos de cloroformo deben ser eliminados calentando la leche hasta unos 65°C, y agitando de forma manual dando un giro circular al matraz.

En el caso concreto del estudio de la Técnica de Tripet et

al.(36B), se utilizaron 100 ml de leche como muestra original, contaminada al mismo nivel que en las otras técnicas, es decir, 0.5  $\mu\text{g}/\text{l}$ , para lo cual se añadían 50  $\mu\text{l}$  de la solución de aflatoxina  $\text{M}_1$  a 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

#### II.5.c. Técnica Propia (Técnica I)

Con esta técnica se investiga la presencia de muy bajos niveles de aflatoxinas en productos lácteos, lo que indica que está orientada fundamentalmente a la determinación de aflatoxina  $\text{M}_1$ , siendo preciso un proceso de limpieza del extracto por cromatografía de adsorción.

##### II.5.c.1. Leche

\* Principio: Las aflatoxinas son disueltas en la fase acuosa de los productos lácteos, tras la alcalinización con una solución de bicarbonato sódico para conseguir una concentración de aproximadamente un 1% de la fase acuosa total.

El bicarbonato sódico es precipitado por Metanol-Acetona, permaneciendo las aflatoxinas en la mezcla Metanol-Acetona-Agua. La centrifugación a baja temperatura elimina las proteínas y lípidos. Finalmente las aflatoxinas son extraídas

con cloroformo, sometiendo dicho extracto a un proceso de limpieza por cromatografía de adsorción.

\* Extracción: Se añaden 7 ml de una solución de bicarbonato sódico al 8.4% a 50 ml de leche en un vaso de centrífuga de acero inoxidable. Se agita y añaden 70 ml de Metanol-Acetona (50-20). Se agita durante 30 segundos. Se centrifuga a 8000 rpm durante 30 minutos manteniendo durante todo el proceso una temperatura inferior a  $-10^{\circ}\text{C}$ .

Una vez finalizado el proceso de centrifugación se lleva el extracto a filtrar con la mayor rapidez posible a través de un papel de máxima porosidad, como puede ser papel COLHOGAR, papel SCOTTEX CASA, o a través de una doble capa de paño de queso.

Al extracto obtenido se añaden 75 ml de cloroformo, con lo que la solución monofásica Metanol-Acetona-Agua se transforma en bifásica. Se agita vigorosamente durante 1 minuto, y se centrifuga para evitar la formación de emulsiones: basta con 8000 rpm durante 5 minutos.

La capa inferior clorofórmica es extraída del vaso de centrífuga con la ayuda de una pipeta de 25 ml y una pera de goma para llenado de pipetas, pasando el extracto a un embudo de decantación de 250 ml. La capa acuosa que queda en el vaso, es extraída una segunda vez con 25 ml de cloroformo. Se centrifuga de nuevo, y el extracto clorofórmico se une al

anteriormente obtenido, pasándose a un matraz de 250 ml. Se añade a dicho matraz sulfato sódico anhidro con objeto de eliminar los posibles restos de agua que pudieran existir; la cantidad de sulfato sódico a añadir es variable dependiendo del agua que pueda conservar el extracto: se incorpora hasta que dicho extracto quede sin turbidez, completamente transparente; ésto normalmente se consigue por la adición de unos 15 g.

Se filtra el extracto clorofórmico a un matraz en forma de pera.

\* Concentración en rotavapor: En primera instancia en el rotavapor se concentra el extracto hasta aproximadamente 1-2 ml, que se pasan a un tubo de centrifuga de 10 ml. El matraz es enjuagado con unos 20 ml de cloroformo, que son concentrados de nuevo, uniéndose el extracto obtenido al anterior.

A ese tubo de centrifuga se acopla un tapón de goma perforado por 2 agujas de mariposa, una de ellas conectada a la fuente de presión de una bomba de vacío, y la otra a un tubo de goma que servirá de salida de ese aire. El tubo de centrifuga se introduce en un baño a 55°C, se aplica presión, con lo que el aire arrastrará el cloroformo, ayudando a concentrar el extracto de una forma rápida.

El extracto va ser sometido a un proceso de limpieza en columna por un proceso de adsorción cromatográfica, para lo

cual es paso previo la concentración de dicho extracto a sequedad, con objeto de eliminar los restos de Metanol y Acetona que pudieran existir, y que nos provocarían un error en el proceso de limpieza en columna por su polaridad. El residuo seco es redisoluto en 5 ml de cloroformo que se van a pasar por una columna cromatográfica en la forma descrita por Stubblefield (16, 353).

\* Limpieza en columna cromatográfica: Se utiliza una columna de cristal de 30x1 cm con placa porosa del número 0, que se rellena aproximadamente hasta su mitad con cloroformo. Se añaden 2 g de Sílica Gel 60 que ha sido lavada con metanol y posteriormente con cloroformo antes de su activación a 110 °C durante 1 hora. Las paredes de la columna son enjuagadas con pequeñas porciones de cloroformo con objeto de arrastrar la sílica que se va quedando en las mismas. Drenamos el cloroformo de la columna hasta justo la capa de sílica, arrastrando la que pueda ir quedando en las paredes con la adición de más cloroformo, dejando finalmente la columna rellena de cloroformo casi en su totalidad. Se añaden 2 g de Sulfato sódico anhidro que quedarán como capa superior a la sílica. Se elimina el cloroformo hasta aproximadamente 1 cm por encima de la capa de sulfato sódico.

El filtrado de cloroformo obtenido en el paso anterior de la técnica, se pasa a través de la columna, dejándolo caer por gravedad. Se lava el tubo de centrifuga donde se ha mantenido el extracto con otros 3-4 ml de cloroformo, que se incorporan



a la columna. Cuando el filtrado alcanza la capa de sulfato sódico, se lava la columna con cloroformo, que se deja caer. Se procede a la limpieza de la columna por aporte sucesivo de los siguientes solventes:

25 ml Tolueno-Acido Acético (9-1).

25 ml Hexano.

25 ml Hexano-Eter-Acetonitrilo (6-3-1).

Los productos obtenidos de tales lavados son descartados.

La aflatoxina  $M_1$  es eluida finalmente con 60 ml de Cloroformo-Acetona (4-1).

El extracto obtenido es concentrado de nuevo en rotavapor.

\* Concentración en rotavapor: Se realiza de la forma anteriormente descrita, dejando el extracto concentrado a 100  $\mu$ l.

\* Cromatografía en capa fina:

-Preparación de las cromatoplasas: Con un peine trazador se dividen las cromatoplasas en 20 franjas de 1 cm de ancho cada una. Se elimina el sílica gel sobrante, y se llevan a activar (colocadas en posición vertical con la ayuda de un bastidor de placas) calentando a 110°C por espacio de 30 minutos. Se guardan en desecador hasta el momento de su uso, en que deben estar a temperatura ambiente.

A cada uno de los extremos de la cromatoplasa hacemos 2 marcas indicadoras, una a 4 cm de la base y otra a 16 cm. Las

primeras serán las indicadoras de la situación donde vamos a colocar las distintas manchas testigo y los extractos problema. Las dos marcas superiores se unen trazando una línea transversal que profundice en la sílica, y que nos indicará la altura hasta donde debe llegar el solvente de desarrollo, y por tanto, con un recorrido para las manchas de 12 cm.

- Colocación de las manchas: Para hacer la cuantificación de aflatoxina  $M_1$  en las muestras problema utilizaremos el método de comparación de fluorescencia de la mancha problema con otras testigo con cantidades conocidas de aflatoxina  $M_1$ . Aquella mancha testigo que presente una intensidad de fluorescencia similar a la de la mancha problema será indicadora de la cantidad de aflatoxina en esta última.

De los 100  $\mu$ l del extracto problema, colocamos 40 en una sola mancha en una cromatoplaque con la ayuda de un dispensador repetitivo de 1  $\mu$ l.

Después de la aplicación de cada  $\mu$ l, se seca la mancha por una corriente de aire con la ayuda de un secador; de esta forma evitamos que el diámetro de la mancha sea excesivo, lo que se traduciría en una mala separación cromatográfica de la aflatoxina.

En una misma placa colocamos las manchas correspondientes de la solución patrón de  $M_1$  en una disolución de 0.1  $\mu$ g/ml, aplicando las siguientes cantidades en microlitros de la misma en distintas manchas: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20,

que serán equivalentes a las siguientes cantidades netas de aflatoxina  $M_1$  en nanogramos: 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.

Por tanto, en teoría, en una misma cromatoplaca podríamos estudiar hasta 9 muestras problema, si bien en nuestras investigaciones este número quedo limitado a 5, para evitar el colocar muestras problema en surcos contiguos, lo que haría después difícil la apreciación de las manchas fluorescentes.

- Desarrollo: Se lleva a cabo en las cámaras de separación cromatográfica (cámaras de desarrollo); en ellas se ha colocado previamente el solvente de desarrollo, 200 ml de la mezcla Cloroformo-Acetona-Isopropanol (170/20/10). La cromatoplaca se coloca en el interior de la cámara en correcta posición vertical y sumergida en el solvente unos 1.4 cm. Se tapa y desarrolla hasta que el frente de solvente alcance la altura indicada, en lo que invierte un tiempo aproximado de 1 hora, durante el cual se mantiene a temperatura de laboratorio.

Una vez cumplido el desarrollo, se saca la cromatoplaca, y se lleva a una cámara oscura de extracción de gases, donde se deja secar bajo corriente de aire. El secado final se hace forzando una suave corriente de aire moderadamente caliente con la ayuda de un secador.

- Interpretación del desarrollo: Se examina la placa bajo luz

ultravioleta de 366 y 254 nm sobre fondo negro y a una distancia de 10 cm de la misma. La aflatoxina  $M_1$  aparecerá:

A 366 nm como una mancha de fluorescencia azul brillante.

A 254 nm como una mancha de fluorescencia azul apagada.

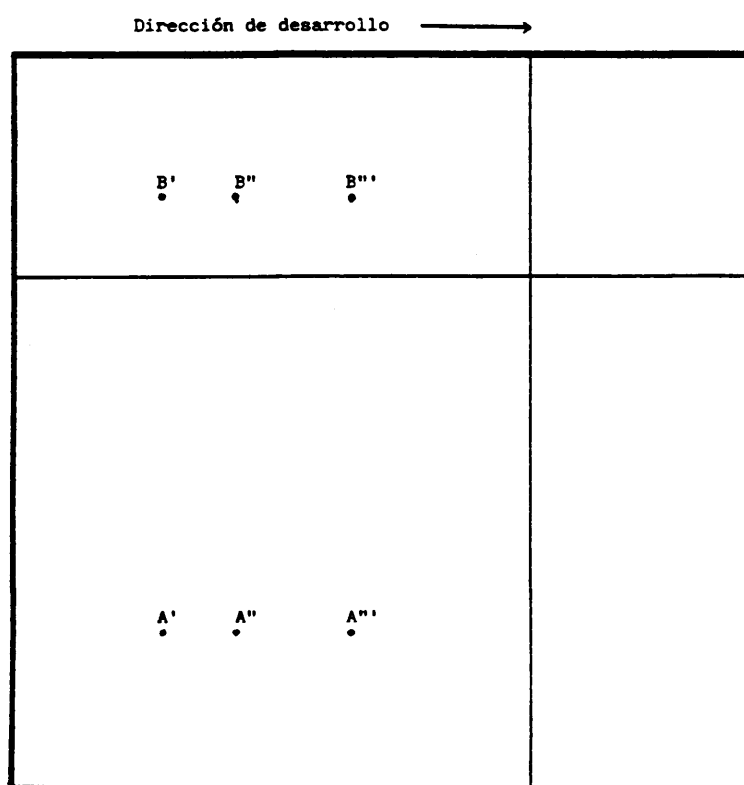
\* Confirmación de la presencia de aflatoxina  $M_1$  :

Existen una serie de métodos que nos confirman que una mancha que consideramos sospechosa de ser  $M_1$  lo es en realidad. Los métodos utilizados por nosotros han sido:

- Pulverización de la cromatoplaca con una solución de ácido sulfúrico - agua (1/3) (344): Una vez observada la cromatoplaca bajo luz UV, se lleva a una cámara de gases donde se pulveriza su superficie; se deja secar y se observa de nuevo bajo luz UV, donde la mancha sospechosa de fluorescencia azul, caso de ser aflatoxina  $M_1$ , se habrá transformado en una mancha con fluorescencia amarillo brillante bajo 366 nm y con un color amarillo apagado bajo 254 nm.

- Prueba confirmatoria del ácido trifluoroacético: Seguiremos la Técnica admitida como oficial por la AOAC, basada en la metodología de Van Egmond et al. (378). Siguiendo la representación de la figura II.1, se colocan en una cromatoplaca de 20 x 20 cm las siguientes manchas: En A' se

Figura II.1 .- Representación de la disposición inicial de las manchas del extracto de la muestra y de la solución patrón para confirmación de la presencia de aflatoxinas según Van Egmond et al.



colocan 40  $\mu$ l del extracto de la muestra, y en B', 25  $\mu$ l de una solución standard de M<sub>1</sub> (2.5 ng de M<sub>1</sub>). Sobre cada una de estas manchas se colocan 2  $\mu$ l de ácido trifluoroacético. Se deja la placa en la oscuridad durante 3-5 minutos a temperatura ambiente. Se cubre con una lámina de cristal de 20 x 20, y se calienta a aproximadamente 75°C. Se deja enfriar sobre una superficie fría y se desarrolla en la oscuridad en la dirección indicada en la figura II.1, utilizando como solvente de desarrollo Cloroformo-Metanol-Acido acético - agua (92-B-2-0.8). Una vez cumplido el desarrollo, se examina la cromatopaca bajo luz UV. El patrón de aflatoxina, situado en B' muestra un pico de fluorescencia amarilla de M<sub>1</sub> que no ha reaccionado con el ácido trifluoroacético en B'', así como una mancha intermedia de fluorescencia azul que es el producto de la reacción de M<sub>1</sub> con el ácido trifluoroacético, y que se sitúa en B''. En caso de que en el extracto problema hubiera M<sub>1</sub>, sucederá algo parecido a lo descrito para el patrón, en las posiciones A'' y A'''.

\* Cuantificación: Como hemos indicado anteriormente, la cuantificación de las aflatoxinas en la muestra problema se hace por comparación visual de la fluorescencia de la mancha problema con una serie de manchas testigo.

Las equivalencias quedan reflejadas en la tabla II.1.

Se considera que la totalidad de las aflatoxinas presentes en la muestra original se encuentran en el extracto clorofórmico

Tabla II.1 .- Nivel de aflatoxina M<sub>1</sub> en los distintos volúmenes de la solución standard y su equivalencia con la cantidad teórica que existiría en 50 ml de leche y su expresión en ppb

μl solución Aflatoxina M <sub>1</sub> 0.1 μg/ml	Aflatoxina M <sub>1</sub> en nanogramos	μg Aflatoxina M <sub>1</sub> en 50ml leche	Aflatoxina M <sub>1</sub> en leche en μg/L
4	0.4	0.001	0.02
6	0.6	0.0015	0.03
8	0.8	0.002	0.04
10	1	0.0025	0.05
12	1.2	0.003	0.06
14	1.4	0.0035	0.07
16	1.6	0.004	0.08
18	1.8	0.0045	0.09
20	2	0.005	0.1

final; ésto hace que la determinación de la aflatoxina M<sub>1</sub> presente en la muestra original se realice por cálculos directos a partir de lo detectado en el extracto, sin necesidad de aplicar fórmula alguna por haber descartado volúmenes intermedios en el desarrollo de la Técnica.

#### II.5.c.2. Yogur

La única diferencia con respecto a lo descrito para la leche se produce en la fase de extracción: 50 g de yogur se llevan a un vaso de centrífuga; se añaden 40 ml de una solución de bicarbonato sódico al 1.9%; Se agita. Se completa con 105 ml de la mezcla Metanol-Acetona (75-30). Se agita vigorosamente durante 30 segundos. A partir de este paso, el proceso continúa de la misma forma ya descrita para la leche.

#### II.5.c.3. Queso

Lo mismo que sucede para el yogur, en este caso la única diferencia se encuentra en cuanto al proceso de extracción: 50 g de queso se colocan en un vaso de batidora; se incorporan 100 ml de una solución de bicarbonato sódico al 1.3%; Se mezcla con la ayuda de una homogeneizadora de brazo vertical, hasta que toma el aspecto de una pasta consistente. Una vez conseguido este propósito, se incorpora dicha pasta a un vaso de centrífuga. El vaso de batidora utilizado antes se



enjuaga con 105 ml de Metanol-Acetona (75-30), que se llevan al vaso de centrifuga, donde se agita toda la mezcla durante 30 segundos. A partir de este momento, todo el proceso de extracción, cromatografía y cuantificación es igual al descrito anteriormente para la leche.

#### II.5.d. Técnica de Lafont et al. (193)

- \* Preparación de la muestra: Se colocan 50 ml de leche en un baño maría en ebullición durante 5 minutos. Se deja enfriar a Temperatura de laboratorio, y se introduce en un embudo de decantación de 500 ml.

- \* Extracción de las aflatoxinas: Se mantiene el embudo de decantación en agitación mientras se añaden lentamente 60 ml de Isopropanol por aportes sucesivos de alícuotas de pocos mililitros; una vez se ha añadido todo el isopropanol, se agita vigorosamente durante 1 minuto.

Se añaden sucesivamente 50 ml de Metanol, 10 g de Celite y 250 ml de Cloroformo. Tras la adición de cada uno de los compuestos citados se somete la mezcla a fuerte agitación durante 1 minuto.

Se mantiene en reposo 5 a 10 minutos, filtrando la capa inferior a través de un papel de filtro Albet nº238 que contiene 10 g de Sulfato Sódico Anhidro.

De este filtrado se toman 300 ml que se introducen en un matraz en forma de pera de 500 ml, pasando a ser concentrado en rotavapor, hasta que restan 5 ml de un líquido que será rico en isopropanol; se añaden al matraz 30 ml de cloroformo, y se prosigue la concentración hasta aproximadamente 0.5 ml. Se adicionan al residuo 30 ml de Tolueno; se concentra una vez más hasta 0.5 ml; el proceso de adición de tolueno y posterior concentración se repite 2 veces más, concentrando finalmente hasta 5 ml.

\* Purificación del extracto por cromatografía en columna: Se emplea una columna cromatográfica con un diámetro interior de 18 mm, y se prepara introduciendo en ella de forma sucesiva los siguientes productos: 10 g de sulfato sódico anhidro, un disco de papel de filtro, 1 g de alúmina básica. Se rellena esta columna con tolueno; agitando ligeramente con una varilla de vidrio se elimina el posible aire existente entre la alúmina. Sobre la capa de alúmina se superpone otro disco de papel de filtro, completando con 2 g de sílica en suspensión en el tolueno. Un nuevo disco de papel de filtro es colocado sobre la sílica, añadiendo encima 2 g de sulfato sódico anhidro.

Los 5 ml del extracto obtenido anteriormente se pasan a través de esta columna. El matraz en forma de pera es lavado con 15 ml de tolueno, que se añaden a la columna. Sobre ésta se procede a realizar sucesivas eluciones con: 50 ml tolueno, 50 ml de cloroformo, y 100 ml de la mezcla Cloroformo-Acetona (4-1). De estas eluciones recogemos únicamente la última, que

pasa a ser concentrada en rotavapor.

En la figura II.2 se muestra un esquema de esta Técnica.

\* Los procesos de Concentración en rotavapor y Cromatografía en Capa Fina siguen la misma metodología descrita para la Técnica I.

\* Cuantificación: La práctica totalidad de las aflatoxinas se encuentran, después de todo el proceso analítico, en el extracto final; el agua no retiene más que trazas ínfimas.

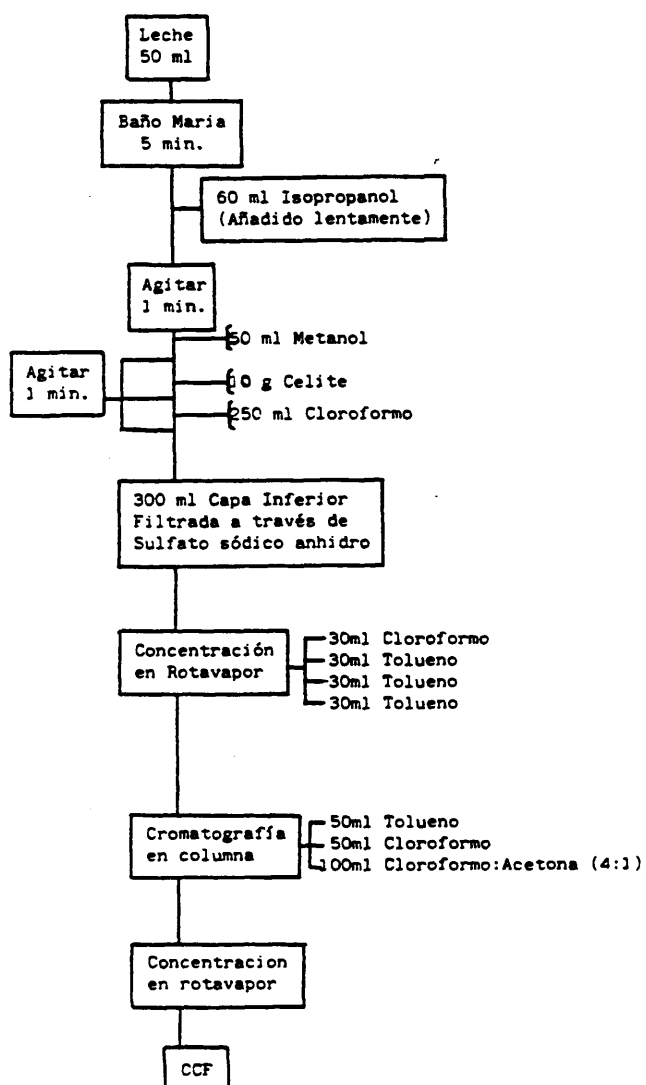
La cantidad presente en los 50 ml de leche se expresa por:

Cantidad  $M_1$  expresada sobre la cromatoplaça  $\times 345/300$

#### II.5.e. Técnica de Tripet et al. (36B)

\* Principio del método: Las aflatoxinas son extraídas de la muestra a analizar por una mezcla Agua-Acetona (1-3), lo que elimina la caseína y la lactosa. Después de la precipitación de otras proteínas y fosfolípidos por una sal de plomo, la solución es desengrasada por la adición de hexano, y las toxinas extraídas por cloroformo. El extracto

Figura II.2 .- Esquema de la técnica de Lafont et al. (193) para la determinación de aflatoxina  $M_1$  en leche



es deshidratado y el solvente evaporado.

\* Extracción de las aflatoxinas: Homogeneizar 100 ml de leche con 10 ml de agua. Se añaden 300 ml de Acetona y se agita durante 5 minutos con la ayuda de un agitador de vaivén.

Se filtra a través de un papel de filtro Albet nº238 a una probeta de 500 ml. Del filtrado obtenido se pasan 300 ml a un matraz de 1 L conteniendo 40 ml de acetato de plomo al 10%; La probeta es lavada con 100 ml de agua, que son incorporadas al matraz. Se agita y se deja reposar durante 15 minutos. Se añaden 10 ml de Sulfato sódico saturado, y se filtra a una probeta de 500 ml. 300 ml del filtrado se llevan a un embudo de decantación de 500 ml, donde se extraen los lípidos por agitación vigorosa durante 1 minuto tras la adición de 100 ml de hexano. La fase orgánica es eliminada y la fase acuosa se lleva a otro embudo de decantación de 500 ml donde se añaden 50 ml de una solución de cloruro sódico al 5%, pasando a extraer durante 1 minuto con 100 ml de cloroformo. Recogemos la fase inferior clorofórmica en un matraz de 500 ml, y la fase acuosa se extrae una segunda vez con 50 ml de cloroformo; la fase orgánica formada se añade al mismo matraz.

El extracto se pasa a través de una columna cromatográfica de 20 mm de diámetro interno y 40 cm de altura, rellena en su mitad de sulfato sódico anhidro (unos 40 g). La solución obtenida es recogida en un matraz en forma de pera de 500 ml; la columna es lavada 3 veces con porciones de 15 ml de

cloroformo que son recogidas en el mismo matraz.

En la figura II.3 se muestra un esquema del desarrollo de esta técnica.

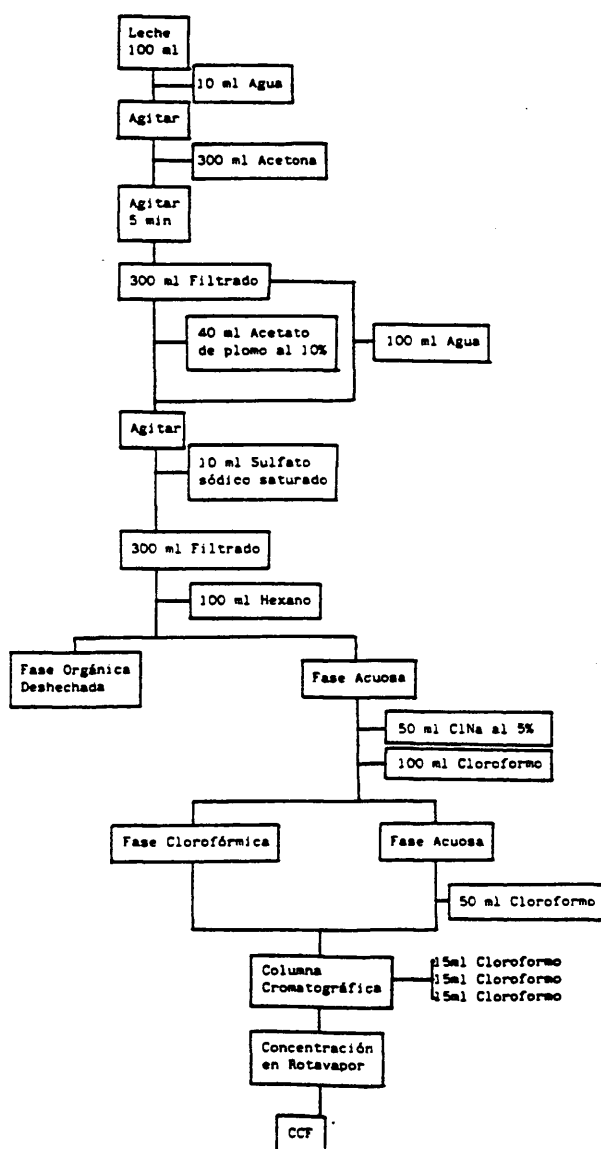
\* Los procesos de Concentración del extracto y Cromatografía en capa fina se llevan a cabo siguiendo el proceso descrito para Técnica I.

\* Cuantificación: Por el cálculo de volúmenes que han sido desechados durante el desarrollo de la Técnica, de los 100 ml de la muestra original, son 50 ml los representados en el extracto final, y a ellos debemos hacer referir los resultados obtenidos.

#### II.5.f. Técnica de Stubblefield modificada por la ADAC (16, 353)

\* Extracción: 50 ml de leche mantenida a temperatura ambiente se mezclan en un embudo separador de 250 ml con 10 ml de una solución saturada de cloruro sódico y con 120 ml de cloroformo almacenado a una temperatura aproximada de 35°C. Se agita durante 1 minuto. Se deja separar en capas durante unos 2 minutos; en caso de formación de emulsiones que impiden esa separación, se centrifuga para romper las mismas,

Figura II.3 .- Esquema de la técnica de Tripet et al. (368) para la determinación de aflatoxinas en leche



bastando 8000 rpm durante 5 minutos. La capa inferior clorofórmica se recoge en una matraz Erlenmeyer de 250 ml, donde se añaden 10 g de sulfato sódico anhidro para eliminar los posibles restos acuosos. Se agita y se deja reposar unos 3 minutos. Se filtra el cloroformo a través de un papel Albet nº 238 a una probeta graduada de 125 ml, midiendo el volumen recogido que nos va a ser después imprescindible en la cuantificación de aflatoxinas.

\* Los procesos de Limpieza en columna cromatográfica, Concentración en rotavapor y Cromatografía en Capa Fina se efectúan en la forma ya descrita para Técnica I.

En la figura II.4 se muestra un esquema de esta técnica.

\* Cuantificación: Las aflatoxinas calculadas en el extracto clorofórmico final no se pueden hacer referir a los 50 ml de muestra de leche original, sino que se debe aplicar la fórmula siguiente:

$$W = Wt \times F / 120$$

Donde:

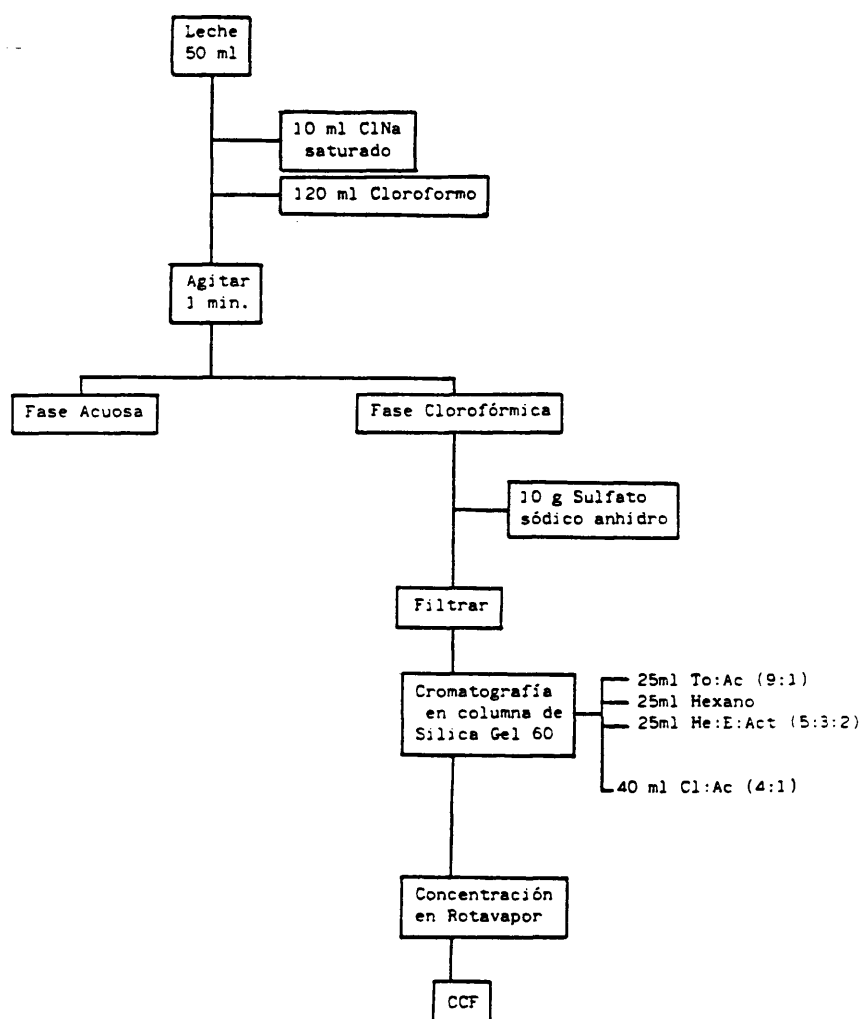
W = Volumen de leche representado en el extracto final.

Wt = Volumen de muestra original (50 ml)

F = Volumen del filtrado tras la adición de cloroformo a la leche



Figura II.4 .- Esquema de la técnica de Stubblefield (16, 353) para la determinación de aflatoxina  $M_1$  en leche



#### II.5.g. Técnica propia (Técnica II)

En comparación con la TECNICA I ya descrita, existen diferencias en cuanto al proceso de CDF, determinado por el hecho de que con esta metodología se investigó la producción experimental de aflatoxinas en yogur y queso, que aun siendo mínima, siempre es muy superior al nivel de  $M_1$  en leche y productos lácteos naturalmente contaminados, lo que hace que su apreciación en cromatoplaaca sea más sencilla, y por tanto, no se precise la limpieza por cromatografía de adsorción.

\* Extracción: Se lleva a cabo en forma idéntica a lo descrito para la Técnica I, tanto para leche como para yogur y queso.

\* Concentración en rotavapor: Se lleva a cabo en la forma descrita.

En este caso, dados los altos niveles de aflatoxinas en el extracto, no va a ser necesario el proceso de limpieza en columna cromatográfica, por lo que la concentración no necesita ser en un primer término a sequedad para eliminar los posibles restos de metanol y acetona, sino que se concentra directamente hasta 1000  $\mu$ l en los tubos de centrífuga.

Este va a ser el extracto final a partir del cual se va hacer la cromatografía en capa fina.

Un esquema de las Técnicas I y II puede ser apreciado en la figura 11.5.

\*Cromatografía en Capa Fina:

- La preparación de la cromatoplaca se lleva a cabo en la forma ya descrita para la Técnica I.

- Colocación de las manchas: Para cada uno de los extractos problema colocamos sobre la línea imaginaria situada a 4 cm de la base de la cromatoplaca las siguientes manchas ocupando franjas consecutivas y aproximadamente en el centro de las mismas: 2 de 1  $\mu$ l y 2 de 10  $\mu$ l.

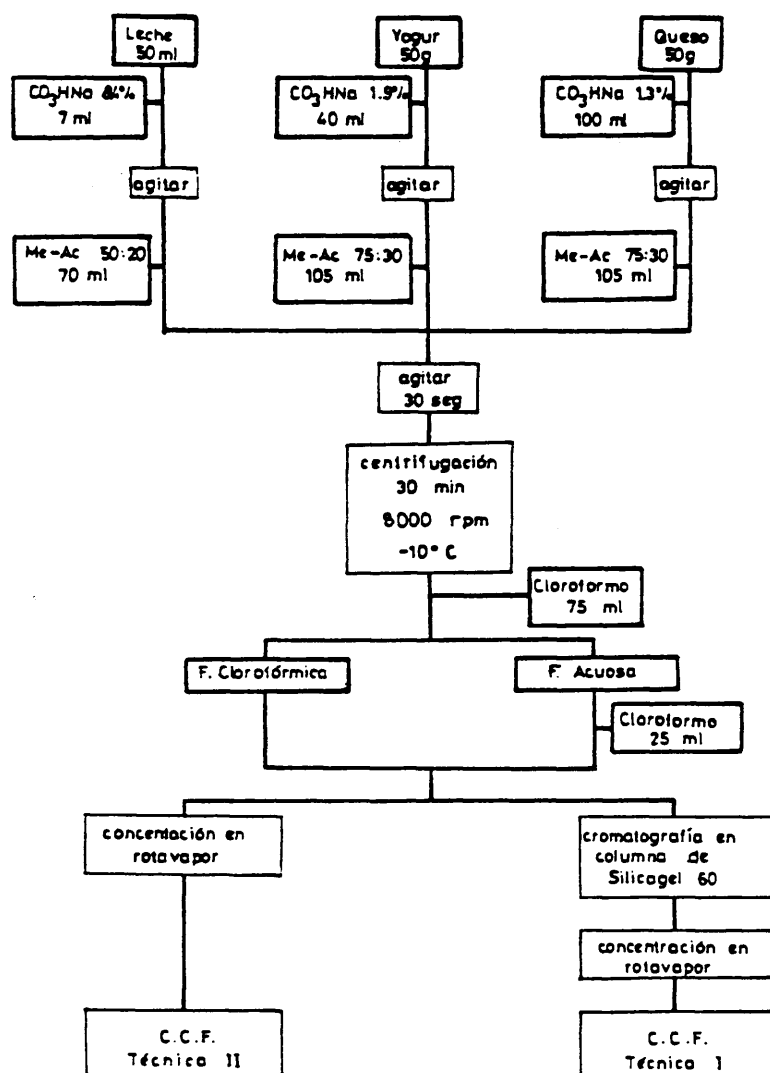
En una de las manchas correspondientes a 1  $\mu$ l y en otra de 10  $\mu$ l, se superponen 5  $\mu$ l de la solución standard patrón conteniendo las cuatro aflatoxinas principales a 5  $\mu$ g/ml cada una y otros 5  $\mu$ l de la solución de  $M_1$  a 1  $\mu$ g/ml (standard interno); en otra mancha aparte se coloca únicamente la solución patrón (standard externo); el diámetro de las manchas una vez finalizado el proceso no debe ser superior a 2-2.5 cm, para lo cual durante el proceso de deposición de los distintos volúmenes en las manchas nos ayudamos de una corriente de aire caliente suministrada por un secador.

En resumen, para cada muestra se utilizarán 5 franjas:

•Una externa que corresponde a los patrones de aflatoxinas. Es el denominado patrón externo.

•Dos con 10 y 1  $\mu$ l del extracto correspondiente a la

Figura II.5 .- Esquema de las técnicas I y II (técnicas propias) para determinación de aflatoxinas en leche



muestra problema.

\*Otras dos con 10 y 1  $\mu$ l a los que se superpone la solución patrón de aflatoxinas empleada. Es el denominado patrón interno.

Por tanto, en cada cromatoplaca podremos estudiar hasta cuatro extractos problema.

\* Desarrollo de la cromatoplaca: De la forma ya descrita, con el mismo solvente: Cl/Ac/Ip (170/20/10).

\* Interpretación del desarrollo: Una vez secas, las cromatoplasas se observan con lámpara de luz ultravioleta a 366 y 254 nm, sobre fondo negro y a una distancia de unos 10 cm de la misma. La fluorescencia con que se observa es:

Aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>: Fluorescencia azul a 366 nm y azul más apagado a 254 nm.

Aflatoxinas G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>: Fluorescencia azul verdosa a 366 nm y verde a 254 nm.

\* Confirmación de la presencia de aflatoxinas:

- Pulverización de la cromatoplaca con la mezcla Ac.sulfúrico-Agua al 1/3: De la forma ya descrita.

- Método de Przybylski (280): Se divide una cromatoplaca en dos zonas iguales (A y B), en cada una de las cuales se colocan la muestra y los patrones (externos e internos) tal y como acabamos de describir en el apartado correspondiente a

la preparación de las cromatoplasmas, quedando la zona A idéntica a la zona B en cuanto a las manchas situadas.

A continuación se tapa la zona A de la cromatoplasma con una lámina de vidrio para protegerla, mientras que sobre cada una de las manchas de la zona B se deposita 1 µl de ácido trifluoroacético. Se deja reaccionar durante 5 minutos, siempre la cromatoplasma protegida de la luz. Se seca con corriente de aire caliente durante 10 minutos y se introduce en la cámara de desarrollo.

Como solvente de desarrollo empleamos Cl/Ac/Ip (170/20/10).

Una vez desarrollada y seca la cromatoplasma, se hace la observación con la lámpara de luz UV, en las condiciones ya indicadas, comparando las dos zonas, A y B.

En la zona A, las aflatoxinas B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub> y M<sub>1</sub> presentarán sus características típicas de fluorescencia y situación; en cambio, en la zona B, esas aflatoxinas se habrán transformado en sus correspondientes hidroxiderivados, aflatoxinas B<sub>2a</sub>, G<sub>2a</sub> y M<sub>2a</sub> respectivamente, las cuales presentarán una fluorescencia más intensa que las originales, y un R<sub>f</sub> aproximadamente 4 veces menor. Estas nuevas aflatoxinas también dan fluorescencia amarilla en la prueba del ácido sulfúrico, que por tanto se puede aplicar para completar la confirmación. Las aflatoxinas B<sub>2</sub> y G<sub>2</sub> permanecerán en la misma situación en ambas zonas, A y B, de la cromatoplasma.

\* Cuantificación: Utilizaremos el método del límite de detección.

Este método se basa en la comparación entre el límite

inferior de visualización de la aflatoxina en la mancha problema y el límite de detección de dicha micotoxina en las mismas condiciones, conocido el factor de dilución de la muestra.

Para ello previamente debemos calcular nuestro límite de detección para las distintas aflatoxinas sobre los distintos sustratos. Para ésto se preparan soluciones patrón de cada una de las aflatoxinas a 0.1 µg/ml, o lo que es lo mismo, 0.0001 µg/ul. Sobre una cromatoplaaca se colocan una serie de manchas de esta solución coteriando las siguientes cantidades: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 µl, que corresponderán a 0.0001, 0.0002, 0.0003, 0.0004, 0.0005, 0.0006, 0.0007, 0.0008, 0.0009 y 0.001 µg de la correspondiente aflatoxina y encima de extractos del sustrato a extraer. Se desarrolla la cromatoplaaca de la forma habitual. La última mancha de las referidas que somos capaces de apreciar visualmente indicara nuestro límite de detección.

Para llevar a cabo la cuantificación de la muestra problema se procede de la siguiente manera:

Se cromatografían cantidades decrecientes del extracto problema (6, 5, 4, 3, 2, 1 µl), determinándose el volumen para el que aún es visualizada la aflatoxina tras el desarrollo de la placa.

Si la micotoxina es visible en todos los volúmenes cromatografiados, se procede a la dilución del extracto, para lo que se toman 20 µl del mismo, que se pasan a un minivial

con 180  $\mu$ l de cloroformo; así obtenemos la dilución 1/10, de la que se cromatografían igualmente una serie de volúmenes decrecientes que se desarrollan como ya se ha indicado.

Si la aflatoxina sigue siendo visible en todas las manchas, se realiza una nueva dilución y un nuevo desarrollo, y así sucesivamente.

Conocido el volumen a que la micotoxina deja de ser visible, dicho volumen del extracto contendrá una cantidad de aflatoxina igual a la de nuestro límite de detección. Por una sencilla regla de tres, se puede calcular la cantidad de aflatoxina en la totalidad del extracto, que será equivalente a la que exista en la muestra original de partida.



#### II.6. DETERMINACION DE AFLATOXINAS EN MUESTRAS DE LECHE COMERCIAL

Se procedió al análisis de un total de 47 muestras de leche UHT comercial procedentes de una Central Lechera de León, que recibía leche de la parte norte de la provincia. Las muestras fueron recogidas a lo largo del año 1985, tratando de aproximarse lo máximo posible a los días 1, 7, 14, 21 y 28 de cada mes, con excepción hecha de los meses de Junio y Septiembre en que no se efectuó tal recogida.

A la llegada al laboratorio, cada muestra era analizada siguiendo los pasos descritos en II.5.c.1. para la Técnica I descrita por nosotros con la prueba confirmatoria de Van Egmond et al. (378). A continuación, cada muestra de leche era congelada, con objeto de repetir la extracción caso que resultara ser positiva o dudosa a la presencia de aflatoxina M<sub>1</sub>.

#### II.7. PRODUCCION DE AFLATOXINAS SOBRE YOGUR

Para el estudio de la capacidad de producción de aflatoxinas por cepas aflatoxicogénicas de colección cuando se desarrollaban sobre yogur se procedió a la investigación por una parte en yogures comerciales (elaborados por una Empresa de ámbito nacional), comparando posteriormente los resultados obtenidos en ellos con los hallados sobre yogur elaborado en nuestro laboratorio. De esta forma se pretendía determinar la influencia que el proceso de elaboración del yogur pudiera tener sobre los hongos aflatoxicogénicos, incluyendo dentro de esta influencia no sólo la elevada temperatura de elaboración (45 °C), sino también el probable efecto de las bacterias lácticas. Por otra parte, podríamos apreciar la posible acción que los conservantes utilizados por la industria en la elaboración de yogures pudieran desarrollar sobre los hongos aflatoxicogénicos.

Una vez desarrollado el hongo sobre el yogur, se procedía a la separación de micelio y sustrato, con objeto de hacer la extracción de aflatoxinas de forma independiente a partir de ambos, y permitir por otra parte la determinación del grado de crecimiento fúngico en forma de peso de micelio seco.

En aquellos casos en que el crecimiento fúngico sobre el yogur fue muy ligero, representado por pequeños filamentos, no se llevaba a cabo tal separación, sino que se determinaba el contenido en aflatoxinas de forma conjunta, siguiendo la

técnica de extracción de aflatoxinas del yogur.

Todas las determinaciones fueron efectuadas por triplicado, tanto del peso de micelio seco como de aflatoxinas en micelio y sustrato.

#### II.7.a. Determinación del crecimiento fúngico sobre el yogur

El crecimiento fúngico se expresó en forma de peso de micelio seco, y se determinó siguiendo la Técnica de Shih y Marth (334), ligeramente modificada por nosotros.

En primer lugar se debía proceder a la separación de hongo y sustrato (yogur), lo que se hacía de forma sencilla por cuanto el hongo presenta un crecimiento bastante compacto. Ayudándonos de unas pinzas, se recogía el micelio, que crece formando una masa redondeada y compacta, adquiriendo la forma de la superficie del yogur, y se llevaba a una placa de Petri de vidrio de 9cm de diámetro.

Se mantenía a 50 °C durante 24h, al cabo de las cuales se dejaba que alcanzara la temperatura ambiente, momento en el cual se procedía a pesar el micelio.

Una vez pesado se introducía en un matraz de 250 ml, donde se llevaría a cabo la extracción de aflatoxinas.

#### II.7.b. Determinación de aflatoxinas en micelio

Se efectuó siguiendo la Técnica de Shih y Marth (333), ligeramente modificada por nosotros.

Al matraz donde se había introducido el micelio se añadían sucesivamente 25 ml Cloroformo + 50 ml Metanol + 20 ml de agua. Se sometía a agitación durante 10 minutos en un agitador de vaivén. Se pasaba la mezcla a un embudo separador de 250 ml sin dejar caer el micelio. Se añadían a dicho embudo 50 ml de cloroformo + 50 ml de agua. Se agitaba vigorosamente durante 1 minuto y se dejaba separar en capas. La capa clorofórmica se dejaba caer gota a gota, filtrando a través de un papel de filtro Albet 238, doblado sobre sí mismo y repleto de sulfato sódico anhidro. El cloroformo filtrado se iba recogiendo en un matraz en forma de pera. Antes de dejar caer la totalidad del cloroformo, se cerraba la llave de paso y se realizaba una segunda extracción de la capa acuosa con 25 ml de cloroformo, agitando 1 minuto. Una vez separado en capas, se filtraba la inferior al mismo matraz en forma de pera siguiendo el proceso ya descrito.

Los procesos de concentración en rotavapor, cromatografía en capa fina y cuantificación se realizan de la forma ya descrita para la determinación de aflatoxinas en yogur siguiendo la técnica II (II.5.g.).

#### II.7.c. Determinación de aflatoxinas en yogur

Una vez separado el micelio del yogur, se tomaban 50g de la parte superior del mismo con la ayuda de una cucharilla, y se llevaban a un vaso de acero inoxidable de 285 ml. La determinación de aflatoxinas en estos 50g se hacía siguiendo todo el proceso ya descrito en II.5.g. (Técnica II).

#### II.7.d. Producción de aflatoxinas sobre yogur comercial

Los yogures nos eran suministrados por una Planta elaboradora de amplia difusión nacional, que colaboró en nuestros estudios. Los yogures eran recogidos en dicha Planta nada más finalizar su proceso de elaboración, cuando comenzaba su periodo de almacenamiento para posterior distribución y venta. Eran transportados a nuestro laboratorio en un contenedor que mantenía temperatura de refrigeración durante el trayecto.

##### II.7.d.1. Inoculación

Se efectuaba a la llegada de los yogures al laboratorio, para lo que seguíamos el proceso descrito en II.4. sobre recogida

de una suspensión de esporas de la cepa aflatoxicogénica.

En cada yogur se inoculaban  $4-5 \times 10^5$  esporas, para lo cual se tomaba parte de dicha solución homogeneizada con una jeringa de 5 ml, a la que se acoplaba su correspondiente aguja; se inoculaba perforando la tapa del yogur con esa misma aguja; se dejaba caer la cantidad precisa para alcanzar la concentración de esporas indicada, y se llevaba a incubación. Dicha jeringa tiene subdivisiones de 0.5 ml; por tanto, en caso de que para esta cantidad se sobrepasara el número de esporas a inocular, se hacía una dilución de la solución inicial de esporas.

#### 11.7.d.2. Incubación

Los siguientes parámetros fueron objeto de estudio dentro de la producción de aflatoxinas sobre yogur comercial:

- Temperatura: 28, 15 y 10°C.

- Condiciones del envase: Se estudió la diferencia de producción de aflatoxinas en envases intactos y en aquellos que pudieran haber sufrido un pequeño daño.

\* Envase intacto: después de haber llevado a cabo la inoculación en la forma descrita, el pequeño orificio causado por la aguja era cerrado con una triple capa de parafilm,

adherida perfectamente a la tapa.

\* Envase dañado: El orificio de inoculación se dejaba abierto.

- Periodo de incubación: El tiempo de incubación máximo para el estudio de la producción de aflatoxinas en yogur comercial se estableció en 21 días, por ser éste el periodo de caducidad del yogur, si bien en algunos casos en que en este tiempo no se pudo detectar producción de aflatoxinas, se dejó incubar hasta los 25 días. El tiempo mínimo se definió como aquél en que se comenzaban a apreciar pequeños filamentos fúngicos, indicadores del crecimiento.

Combinando estos tres parámetros, se efectuaron los siguientes estudios sobre producción de aflatoxinas en yogur comercial:

- 1) En envase dañado a 28°C.
- 2) " " intacto a 28°C.
- 3) " " dañado a 15°C.
- 4) " " intacto a 15°C.
- 5) " " dañado a 10°C.

Una vez finalizado el proceso de incubación, el primer paso antes de llevar a cabo cualquier tipo de estudio era proceder a la inactivación del hongo aflatoxicogénico, para lo cual se rociaba el moho con cloroformo, con la ayuda de una pipeta.

#### II.7.e. Producción de aflatoxinas sobre yogur elaborado por nosotros

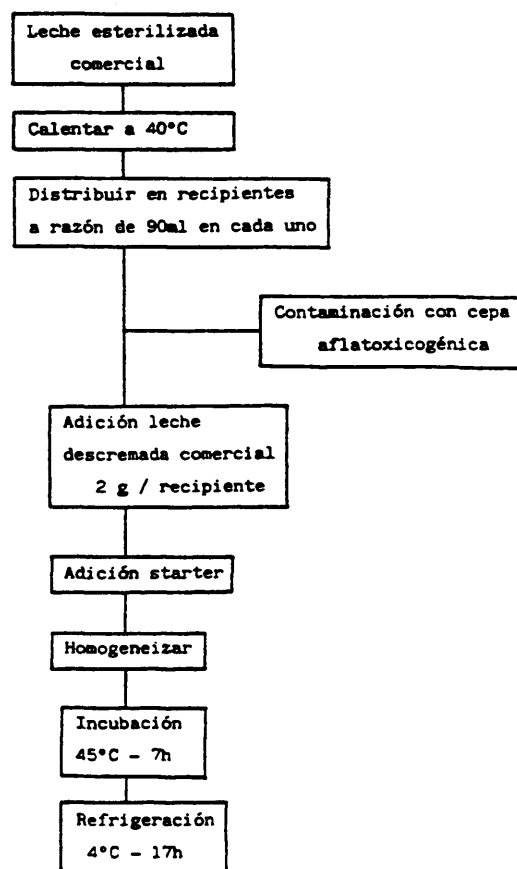
##### II.7.e.1. Proceso de fabricación del yogur

Seguimos la técnica tradicional de fabricación del yogur, que era elaborado en recipientes estériles tipo MAYFAR de 100 ml de capacidad, en lotes de 8 en cada procesado. A cada recipiente se añadían 90 ml de leche esterilizada y homogeneizada comercial a una temperatura de unos 40°C. Se completaba con una cucharada pequeña (2g) de leche descremada comercial en polvo con objeto de aumentar la concentración de sólidos totales, y con ello la consistencia del futuro yogur, alcanzando lo que se considera medida ideal de sólidos totales del mismo, que es de un 15-16%; Se añadía el cultivo starter, constituido por un 1% de yogur comercial. Se homogeneizaba toda la mezcla con la ayuda de una cucharilla, y se llevaba a incubación a 45 °C durante 7 horas en una yogurtera doméstica BRAUN. Al término de dicho proceso de incubación, se mantenía en refrigeración a 4°C durante 17 horas con objeto de que se completara el proceso de fermentación. Al cumplirse este plazo, se llevaba a incubación a la temperatura y en las condiciones objeto de estudio.

En la figura II.6 podemos apreciar un esquema del proceso de



Figura II.6 .- Esquema del proceso de elaboración del yogur siguiendo la metodología tradicional



elaboración del yogur seguido por nosotros.

#### 11.7.e.2. Inoculación

Se realizó por una suspensión de esporas preparada de la forma descrita en 11.4., y con inoculación de  $4-5 \times 10^5$  esporas por yogur, excepción hecha de los estudios sobre la influencia del tamaño del inóculo sobre la producción de aflatoxinas.

#### 11.7.e.3. Incubación

Los estudios sobre la producción de aflatoxinas en yogur elaborado por nosotros en el laboratorio incluían los siguientes parámetros:

- Cepas aflatoxicogénicas de colección: Se utilizó principalmente la cepa A.parasiticus NRRL 2999, completando las investigaciones con la cepa A.flavus NRRL 3251 para estudiar las variaciones que pudieran existir entre las distintas cepas aflatoxicogénicas en cuanto a desarrollo y producción de aflatoxinas.

- Momento de la inoculación: El proceso de inoculación tiene lugar tras la adición de leche al tarrito MAYFAR, simulando por tanto contaminación inicial de la leche por

esporas del hongo aflatoxicogénico. Junto a estos estudios, se elaboraron yogures control, sin inocular, con objeto de ser contaminados una vez finalizado su proceso de elaboración, y comparar así los resultados obtenidos de esta forma con los del yogur comercial. En ellos la inoculación se realizaba con la misma metodología que en el caso de los yogures comerciales.

- Condiciones de elaboración: Se pretendía estudiar la influencia que pudiera tener sobre el desarrollo del hongo aflatoxicogénico la elaboración en condiciones aerobias en comparación con lo que sucedería en condiciones de microaerofilia. Para ello, en el primer caso los yogures se introducían en la yogurtera sin su tapa (proceso tradicional de fabricación) siendo mantenidos en refrigeración con su tapa. En el segundo caso, todo el proceso de elaboración, tanto la incubación a 45°C como la posterior refrigeración se realizaban con el yogur cubierto con su tapa, recubierta a su vez con parafilm, para asegurar un cierre perfecto.

- Periodo de incubación: Se estudió un periodo máximo de incubación de 21 días, tiempo considerado como periodo de caducidad del yogur, que al igual que en el caso de los yogures comerciales, se pudo prolongar en aquellos casos en que en 21 días no pudo ser detectado crecimiento. El tiempo mínimo era aquél en que se comenzaban a apreciar pequeños filamentos fúngicos.

- Temperatura de incubación: 28, 15, 10°C, y también se estudiaron temperaturas cíclicas, manteniendo el yogur durante 24 horas a 28°C, llevando después a incubación a 10°C.

- Condiciones del envase durante la incubación: Una vez finalizado el proceso de elaboración del yogur, se llevaba a incubación. Para ello en unos casos se procedía destapando el contenedor, y cubriéndolo con una capa de papel de aluminio, en la que se practicaba un pequeño orificio con una aguja estéril. De esta forma se simulaba la incubación en envase dañado. En otros casos el yogur era cubierto con su tapa y recubierto por parafilm, simulando incubación en envase intacto.

Combinando estos parámetros se llevaron a cabo los siguientes estudios sobre producción de aflatoxinas en yogur elaborado por nosotros:

- 1) Elaboración destapado e incubación en envase dañado a 28°C.
- 2) " " " " " " " " 15°C.
- 3) " " " " " " " " intacto a 28°C.
- 4) " " " " " " " " 15°C.
- 5) " " tapado " " " " 28°C.
- 6) " " " " " " " " 15°C.
- 7) " " destapado " " " " dañado a 10°C.
- 8) " " " " " " " " 24h a 28°C y después a 10°C.

- 9) Inoculación posterior a la fabricación e incubación a 28°C.  
10) " " " " " " " " 15°C.  
11) Proceso de elaboración destapado e incubación en envase dañado a 28°C, inoculando con la cepa aflatoxicogénica Aspergillus flavus NRRL 3251.

- Influencia del tamaño del inóculo: Se procedió a inocular yogures antes del proceso de elaboración con una distinta cantidad de esporas con objeto de comprobar su posible influencia sobre la producción de aflatoxinas.

Para llevar a cabo estos estudios, se preparó una suspensión de esporas siguiendo el proceso descrito en II.4., con  $4 \times 10^6$  esporas/ml. Se prepararon diluciones decimales a partir de ésta empleando como diluyente una solución salina Ringer con Tween 80, hasta llegar a una que en teoría contendría 40 esporas/ml.

De cada una de las diluciones obtenidas, se inoculó 1 ml siguiendo el proceso descrito en II.7.d.1., y se llevó a cabo la extracción a los 10 días a 28°C.

De esta forma se estudió la producción de aflatoxinas sobre yogur elaborado por nosotros, inoculado con los siguientes tamaños de inóculo:

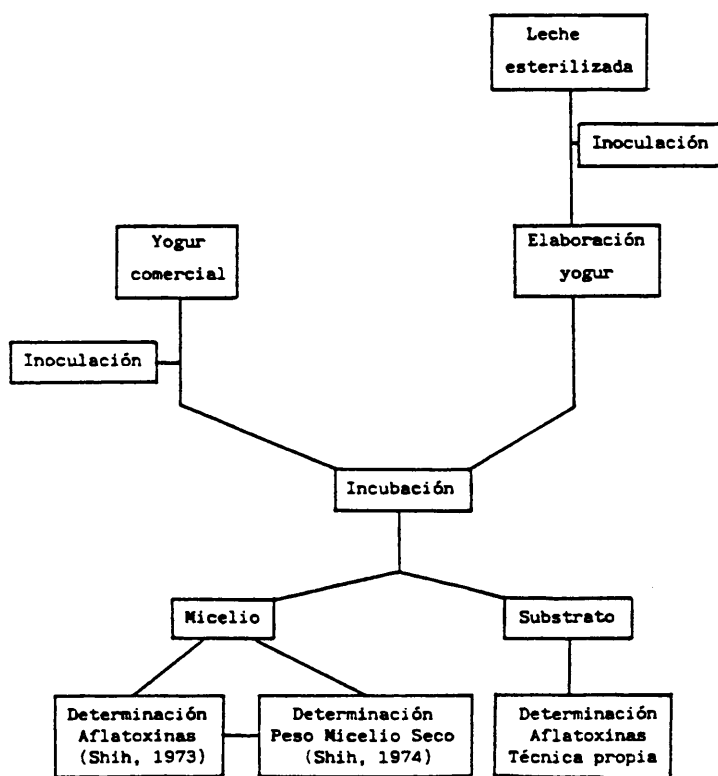
- $4 \times 10$  esporas
- $4 \times 10^2$  "
- $4 \times 10^3$  "
- $4 \times 10^4$  "

- 197 -

• 4 x 10<sup>5</sup>        "  
• 4 x 10<sup>6</sup>        "

En la figura II.7 se muestra un esquema de los estudios llevados a cabo por nosotros sobre la producción de aflatoxinas en yogur.

Figura II.7 .- Esquema de los estudios realizados sobre la producción de aflatoxinas en yogur



## II.8. INFLUENCIA DEL PROCESO DE ELABORACION DEL YOGUR SOBRE LA AFLATOXINA M<sub>1</sub>

Se investigó la posibilidad de degradación de la aflatoxina M<sub>1</sub> durante el proceso de elaboración del yogur, así como durante su almacenamiento en refrigeración durante 21 días, tiempo considerado como caducidad de este producto.

### II.8.a. Proceso de elaboración del yogur

Se llevó a cabo siguiendo los pasos ya descritos en II.7.e.1.

### II.8.b. Inoculación de las aflatoxinas

Se efectuó la contaminación con una solución de aflatoxina M<sub>1</sub> patrón en cloroformo. 800 ml de leche se contaminaban con 4 ml de una solución de M<sub>1</sub> a 1 µg/ml, es decir, con 4 µg de aflatoxina en total, o lo que es lo mismo, con 5 ppb. El cloroformo se eliminaba por calentamiento del matraz en un baño maría a 65°C mientras se mantiene en agitación manual; posteriormente se dejaba enfriar hasta 40°C antes de iniciar la elaboración del yogur.

Con los 800 ml de leche se elaboraron 7 yogures, en los cuales se procedió a la extracción de aflatoxinas en los



siguientes momentos:

- \* Tras 7h de incubación a 45°C.
- \* Tras 17h de refrigeración (fin del proceso de elaboración).
- \* Tras 24h de almacenamiento a 4°C.
- \* Tras 7 días de almacenamiento a 4°C.
- \* Tras 10 días de almacenamiento a 4°C.
- \* Tras 15 días de almacenamiento a 4°C.
- \* Tras 21 días de almacenamiento a 4°C.

Asimismo, se procedió a la extracción de 50 ml de leche contaminada para ser utilizados como referencia. También 50 ml de leche antes de la inoculación fueron extraídos para aflatoxinas para comprobar su ausencia en la misma.

Estas experiencias fueron efectuadas por duplicado, por la elaboración de 2 lotes de yogures siguiendo este mismo proceso en ambos.

#### II.B.c. Extracción de aflatoxinas

Se llevó a cabo siguiendo la Técnica II descrita en II.5.g. para extracción de aflatoxinas en leche y yogur.

#### II.9. PRODUCCION DE AFLATOXINAS SOBRE QUESO MADURADO

Se estudió la capacidad de producción de aflatoxinas por una cepa aflatoxicogénica de colección, Aspergillus parasiticus NRRL 2999, sobre queso Madurado en condiciones experimentales, simulando distintas formas de contaminación del queso y distintas posibilidades de almacenamiento del mismo.

##### II.9.a. Proceso de fabricación del queso Madurado

Los distintos quesos utilizados en nuestros estudios fueron elaborados en varios lotes, partiendo cada vez de 35 L de leche de mezcla.

En primer lugar describiremos el proceso general de elaboración de queso Madurado, que es en esencia similar al seguido para el queso Manchego (35), para citar a continuación el punto y la forma en que se había llevado a cabo la inoculación del hongo toxicogénico.

Para nuestros estudios contamos con la colaboración de Central Quesera, S.A., que nos suministró parte del material necesario para poder efectuar la elaboración, prestándonos su asistencia técnica en todas aquellas dudas que nos fueron surgiendo referidas a la tecnología de elaboración del queso

Madurado.

La leche de partida nos fue suministrada por Central Quesera, S.A., y presentó las características citadas en II.1.h.

Esta leche había sido sometida en la propia Central a un proceso de pasteurización a 72 °C durante 15 segundos en un pasteurizador de placas, tras lo cual se introducía en una cántara higienizada de cierre no hermético, donde se sometía a refrigeración a 4 °C. Cuando la leche alcanzaba esta temperatura, se transportaba a nuestro laboratorio en las mismas cántaras, en un vehículo no dotado de condiciones isotérmicas. El transporte hasta el laboratorio nunca excedió de un tiempo de 45 minutos. A la recepción en el mismo se procedía a verificar el valor del pH, para comprobar de esta forma las condiciones higiénica de esa leche.

A continuación, la leche era calentada en la propia cántara, haciendo uso de un quemador de gas butano, mientras se removía constantemente con la ayuda de un cucharón de latón.

Se calentaba hasta que la leche alcanzara una temperatura de 32-33 °C; en este momento se procedía a la adición de Cloruro Cálcico, en la proporción de 13.5 g por 100 L de leche, siempre manteniendo la agitación. Se dejaba actuar el  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  durante unos 5 minutos.

Se distribuía la leche a partes iguales en dos recipientes (17.5 L en cada uno), que se introducían en un baño de agua caliente que permitía mantener la temperatura de la leche en unos 34 °C.

Se adicionaba el cultivo láctico comercial (preparado en la forma descrita en II.1.1.h.), en una proporción al 1%

Se mantenía agitando durante unos 5 minutos, y se añadía el cuajo (2.5 g por 100 L), y tras remover durante unos 2-3 minutos, se dejaba reposar, verificando la temperatura cada 10 minutos para que no sobrepasara esos 34°C, ni disminuyera tampoco por debajo de los 31°C.

El tiempo que se dejaba reposar era variable, normalmente unos 30-40 minutos, hasta que la cuajada adquiría la consistencia idónea. Para establecer el momento en que se había alcanzado esta consistencia se utilizaban procedimientos seguidos por los maestros queseros (J.Lizarralde, comunicación personal), dentro de los que se incluye la llamada "prueba del dedo", consistente en introducir el dedo en la cuajada sacándolo paralelo a su superficie; cuando los dos bordes formados en la cuajada volvían a su posición original, cerrando el hueco formado, por donde salía una pequeña cantidad de suero, era el instante en que la cuajada había alcanzado una consistencia idónea. Otra forma de considerar que una cuajada presentaba la consistencia precisa era el momento en que se podía desprender de las paredes del contenedor sin perder en absoluto su forma, dejando salir suero por esos resquicios.

Una vez coagulada, se cortaba la cuajada con una lira de alambre, dando lugar a la formación de pequeños granos de cuajada, con un tamaño aproximado de 5 a 10 mm.

Después del corte de la cuajada, se procedía a la separación del suero, proceso que llevamos a cabo dentro de un barreño, con objeto de poder medir el volumen de suero desprendido. Para ello, íbamos pasando cuajada del recipiente a un gran colador, donde iba quedando retenida la cuajada propiamente dicha, dejando pasar el suero. Con movimientos circulares de la misma con la ayuda de una pipeta, conseguíamos dejar caer las últimas porciones de suero, momento en que pasábamos la cuajada a uno de los moldes recubierto por un paño de queso, donde iba a tener lugar el prensado.

La utilización de moldes grandes o pequeños no seguía mayor criterio que la disponibilidad de ambos, prefiriéndose los pequeños por contar así con mayor número de quesos para hacer nuestros estudios.

La cantidad de suero obtenido de los 17.5 L de leche en cada recipiente, estuvo en todos los casos entre 14.1 L y 15.2 L.

Una vez repleto el molde de cuajada, se doblaba el paño sobre la misma, envolviéndola totalmente, cubriéndose con su tapadera correspondiente. Se trasladaban todos los moldes llenados en un lote, a un cuarto con temperatura ambiente oscilante entre 15 y 18° C, donde se procedía al prensado. Para esto disponíamos de una pesada losa de marmol, sobre la que se depositaban dos cántaras con 40 L de agua cada una. Se mantenían prensados durante 6 horas, tras las cuales se les daba la vuelta, para lo cual se sacaba el queso del

molde, y se volvía a introducir en él en forma invertida, doblando de nuevo el paño. Se dejaba otras 2-3 horas, momento en que se daba por concluido el proceso de prensado. Se sacaban los quesos del molde, y se introducían en una solución de salmuera de 25° Beaumé, donde permanecían por espacio de 16-18 horas. En algunos casos se procedió a la esterilización de esta salmuera, para eliminar hongos contaminantes presentes en la misma, y que podían dar lugar a un crecimiento competitivo. Aquellos casos en que se utilizó esta salmuera estéril para salar los quesos serán indicados en su momento. Cumplido este periodo, se sacaban de la solución, y se dejaban secar en el mismo cuarto sobre una superficie horizontal, durante unas 2 horas.

Una vez secos, se pesaban y llevaban a madurar, para lo cual empleábamos estufas de temperatura graduable reguladas a 15°C y con un elevado contenido en humedad (85-90 %), intentando siempre guardar el mayor paralelismo posible con el proceso industrial de elaboración de queso Manchego.

Algunos de los quesos fueron parafinados tras quince días de madurado, por inmersión en una fuente con parafina industrial.

#### 11.9.b. Incubación y Estudio

#### II.9.b.1. Inoculación

Como inóculo se utilizó en unos casos una suspensión de esporas obtenida en la forma ya descrita en II.4., y en otros un asa cargada recogida de un cultivo de Aspergillus parasiticus NRRL 2999 crecido sobre Agar Patata Dextrosa durante 7 días a 28°C. Con esto se buscaba apreciar las diferencias de desarrollo a partir de esporas o a partir de micelio.

La producción de aflatoxinas sobre queso Madurado se investigó en los siguientes casos:

##### 1. Inoculación de la leche con una suspensión de esporas:

El objeto de estos estudios era investigar la capacidad de producción de aflatoxinas sobre queso Madurado cuando la leche de partida se encuentra contaminada con esporas de un hongo toxicogénico. La inoculación se realizaba por simple adición de la suspensión de esporas al contenedor de 17.5 L una vez que la leche con el cloruro cálcico había alcanzado una temperatura de 34°C, y antes de proceder a la adición del starter. Tras la incorporación de las esporas, se removía bien con el cucharón de latón.

Con la ayuda de un contenedor estéril de 50 ml, y con las máximas precauciones posibles en cuanto a esterilidad se

refiere, recogíamos una porción de suero y otra de cuajada para llevar a cabo con las mismas el recuento de esporas del A. parasiticus inoculado, y conocer de esta forma la distribución de las mismas entre suero y cuajada. Este recuento se lleva a cabo siguiendo la Técnica de diluciones decimales a partir de la muestra.

En el caso del suero, se tomaba 1 ml con la ayuda de una pipeta digital estéril. Se suspendía en 9 ml de agua de peptona al 1% con Tween 80, con lo que se tenía preparada la dilución 1/10 ó  $10^{-1}$ . A partir de ésta, se continuaban haciendo diluciones hasta la  $10^{-4}$ . De cada una de estas diluciones se depositaban 100  $\mu$ l sobre la superficie del medio de cultivo Agar Patata Dextrosa, extendiéndose sobre la superficie del mismo con la ayuda de un asa de Drigalski.

En el caso de la cuajada, bien exprimida, considerada como queso, se tomaban 2 g que se incorporaban a un contenedor estéril de plástico de 40 ml de capacidad, al que se añadían 18 ml de agua de peptona al 1% con Tween 80; se homogeneiza lo mejor posible con la ayuda de una espátula de acero inoxidable esterilizada a la llama; se tomaba 1 ml de la mezcla originada, y se procedía a realizar las diluciones y la siembra en la forma ya indicada para el suero.

Las placas sembradas se incubaban a 25°C durante 3-4 días, pasando a contar el número de colonias de Aspergillus en aquellas placas donde el número de las mismas estuviera entre 30 y 300.



Todos los recuentos se efectuaron siempre por duplicado.

Dentro de los estudios de contaminación de la leche con una suspensión de esporas, se elaboraron 2 lotes de quesos:

- Quesos Q1 (877g) y Q2 (1091g). La leche original se contaminó con 14 ml de una suspensión de esporas conteniendo  $4 \times 10^5$  esporas/ml, por tanto los 17.5 L de leche contenían  $64 \times 10^5$  esporas. Estos quesos fueron parafinados a los 15 días de comenzado el periodo de maduración. La toma de muestras se efectuó en el Q1 tras 30 días de madurado, y en Q2 al finalizar el mismo (60 días).

- Quesos Q3 (904g) y Q4 (961g). La leche se inoculó con 32 ml de una suspensión de esporas a  $118 \times 10^4$ /ml, es decir, en los 17.5 L de leche  $3776 \times 10^4$  esporas. Estos quesos fueron salados por inmersión en salmuera estéril, y no fueron parafinados. En ambos la toma de muestras se efectuó a los 60 días de madurado.

## 2. Inoculación en superficie:

El objetivo era el estudio de la capacidad de producción de aflatoxinas por cepas aflatoxicogénicas creciendo sobre queso madurado cuando se procede a la contaminación durante el

madurado del queso, simulando presencia de hongos aflatoxicogénicos en la sala de curado del mismo. En este caso se elaboraron:

- Quesos Q5 (795g), Q6 (893g) y Q7 (756g). La inoculación se llevó a cabo con asa de platino cargada con inóculo, y se realizaba en 8 puntos sobre la superficie del queso, formando un círculo, y uno más central. Por el crecimiento de otros hongos no deseables, principalmente pertenecientes al Género Penicillium a los 10 días se limpiaron los quesos Q5 y Q7 con un paño húmedo, procedimiento que nos fue recomendado por los técnicos de Central Quesera, S.A. (J.Lizarralde, comunicacion personal), dejando el Q6 sin limpiar para el estudio del crecimiento competitivo del Aspergillus. Los tres quesos fueron parafinados a los 15 días de iniciada la maduración. En Q5 y Q6 se efectuó la toma de muestras a los 60 días de madurado, y en Q7 a los 30.

- Quesos Q8 (652g) y Q9 (722g). La inoculación se llevó a cabo en la misma forma descrita para los quesos Q5, Q6 y Q7. A los 7 días se limpió el queso Q9. En este caso no se parafinaron los quesos. Ambos quesos se trocearon a los 60 días de madurado.

- Quesos Q10 (518g) y Q11 (672g). En principio, la única diferencia con el caso anterior es que el proceso de salado se llevó a cabo en salmuera estéril. A los 30 días de madurado el queso Q11 se limpió y llevó a una jarra estéril

tapada con papel de aluminio, donde se repitió la inoculación, esta vez con 5 ml de una suspensión de esporas preparada en la forma ya indicada y con aproximadamente  $4 \times 10^5$  esporas/ml. A continuación se llevó a incubar a 28°C durante 30 días. Con el queso Q10 se realizó este mismo proceso descrito para el queso Q11, pero una vez finalizados los 60 días de curación. De esta forma se estudiaba la posibilidad de desarrollo del hongo aflatoxicogénico sobre queso Madurado a una temperatura más apta para su crecimiento que los 15°C de la sala de madurado.

### 3. Inoculación en el centro de un queso ya elaborado:

Se estudió de esta forma la capacidad del hongo para desarrollarse en el interior del queso, y a partir no sólo de esporas, sino también de micelio.

Una vez finalizado el proceso de elaboración del queso Madurado, y cuando comienza su periodo de maduración, se procedía a quitar una porción del mismo con la ayuda de una sonda de queso, llegando hasta aproximadamente el punto central del mismo; se quitaba esa porción y se inoculaba un asa bien cargada del hongo recogida en la forma ya descrita en 11.4. El contenido de dicha asa, con micelio y esporas, se dejaba sobre el fondo del hueco dejado en el queso. Se tapaba con la porción antes sacada de ese mismo lugar, y se recubría con parafina estéril, líquida pero a una temperatura no demasiado elevada para evitar que al caer sobre el hongo

pudiera inactivar el mismo.

Se llevaba a madurar. De esta forma se estudiaron los siguientes quesos:

-Quesos Q12 (879g), Q13 (779g) y Q14 (832g). A los 15 días de iniciado el proceso de maduración, estos quesos se limpiaron, y después se procedió a su parafinado en la forma descrita anteriormente. La toma de muestras se efectuó a los 30 (Q12), 45 (Q14) y 60 días (Q13).

- Queso Q15 (686g): Este queso no fue sometido al proceso de parafinado. La toma de muestras se efectuó a los 60 días de madurado.

A estos quesos habría que añadir los elaborados como Controles (3) y aquellos que posteriormente serían utilizados para la obtención de porciones y macerado de queso, como indicaremos en el apartado correspondiente.

#### 4. Producción de aflatoxinas sobre porciones de queso Madurado:

Se investigó la producción de aflatoxinas sobre queso Madurado cortado en porciones, con objeto de determinar la influencia que pudiera tener la corteza del queso sobre la producción de aflatoxinas en el mismo. Establecimos una

distinción:

a/ Porciones de queso elaborado por nosotros: Se obtenían porciones de forma paralelepédica de la parte central de queso elaborado por nosotros, evitando la aparición de corteza, que podría llevar consigo otros hongos contaminantes. Para cortar estas porciones se utilizó un cuchillo flameado a la llama.

Tras 30 días de madurado se procedió al troceado de un queso no inoculado, dando lugar a distintas porciones que se colocaron en placas de Petri de plástico estériles de 15 cm de diámetro. Estas porciones fueron denominadas T1 (43.5g), T2 (30g) y T3 (38g). Se inocularon rociando su superficie con 5 ml de una suspensión de esporas del hongo aflatoxicogénico. Se incubaron a 28°C, durante 8, 11 y 20 días respectivamente. Tras 60 días de madurado se troceó otro queso, obteniéndose las porciones T4 (42g) y T5 (44.5g). Se inocularon con una suspensión de esporas y se incubaron, la primera a 15°C durante 25 días y la segunda a 28°C también durante 25 días.

b/ Porciones de Queso Madurado comercial: Este queso fue obtenido en un establecimiento comercial, y se procedió a su troceado en porciones con un cuchillo esterilizado a la llama, eliminando las partes externas del mismo para evitar contaminaciones. Las porciones se colocaron en placas de Petri estériles de 15 cm de diámetro, y se inocularon con 5 ml de una suspensión de esporas. Las porciones así obtenidas fueron denominadas:

- T6 (49.8g) y T7 (46.7g), incubadas a 28°C.
- TB (43.7g) y T9 (49.7g), incubadas a 15°C.
- T10 (50.3g) y T11 (60.6g), incubadas a 10°C.

#### 5. Producción de aflatoxinas sobre queso triturado:

Nuestro objetivo era estudiar las variaciones existentes entre la producción de aflatoxinas sobre porciones de queso y sobre un triturado del mismo con aspecto pulverulento.

En principio se troceó el queso, y posteriormente se maceró en un mortero, hasta que quedó en forma de pequeños gránulos. De esta forma se obtuvieron las muestras M1 y M2 a partir de queso elaborado por nosotros (tras 30 días de madurado), que se inocularon con 5 ml de una suspensión de esporas, y se llevaron a incubar a 28 ° C durante 8 y 11 días respectivamente. De queso madurado 60 días, se obtuvo la muestra M3, que se inoculó de la misma forma y se incubó a 15°C durante 20 días.

#### 6. Producción de aflatoxinas sobre pasta de queso:

Se estudió la influencia que el aporte de agua podía tener sobre la producción de aflatoxinas en queso.

En primer lugar se procedió a triturar el queso en un mortero; a 100 g del mismo se añadían 100 ml de agua destilada. Esta pasta se introducía en un matraz erlenmeyer

- 214 -

estéril de 500 ml, y cubierto con algodón hidrófobo. Se inoculaba rociando la superficie de la pasta con una suspensión de esporas.

De esta forma se obtuvieron las siguientes muestras:

- R1, a partir de queso madurado 30 días, para incubar a 28°C durante 11 días.

- R2, a partir de queso madurado 60 días, para incubar a 15°C durante 16 días.

- R3, a partir de queso comercial, para incubar a 10°C durante 20 días.

En resumen, los distintos tipos de contaminación posible de queso Madurado que han sido estudiados por nosotros han sido:

1.- Inoculación de la leche original con suspensión de esporas:

- Queso parafinado: Q1 y Q2.

- Queso sin parafinar y salado en salmuera estéril: Q3 y Q4.

2.- Inoculación en la superficie del queso con micelio y esporas:

- 215 -

-Queso parafinado sin limpiar: Q6.

-Queso parafinado y limpiado: Q5 y Q7.

-Queso sin parafinar: Q8 y Q9.

-Queso sin parafinar y salado en salmuera estéril, con posterior incubación a 28°C: Q10 y Q11.

3.- Inoculación con micelio y esporas en el centro del queso al iniciar su maduración:

- Queso parafinado: Q12, Q13 y Q14.

- Queso sin parafinar: Q15.

4.- Inoculación con suspensión de esporas de queso troceado y mantenido en placas estériles:

- Porción obtenida de queso madurado durante 30 días e incubado a 28°C: T1, T2 y T3.

- Porción obtenida de queso madurado durante 60 días e incubado a 28°C: T5.

- Porción obtenida de queso madurado durante 60 días e incubado a 15°C: T4.

- Porción obtenida de queso comercial e incubada a 28°C: T6 y T7.

- Porción obtenida de queso comercial e incubada a 15°C: T8 y T9.

- Porción obtenida de queso comercial e incubada a



10°C: T10 y T11.

5.- Inoculación con suspensión de esporas en queso triturado:

- Macerado obtenido de queso madurado durante 30 días, incubado a 28°C: M1 y M2.

- Macerado obtenido de queso madurado durante 60 días, incubado a 15°C: M3.

6.- Inoculación con suspensión de esporas en pasta de queso:

- Incubación a 28°C: R1.

- Incubación a 15°C: R2.

- Incubación a 10°C: R3.

II.9.b.2. Toma de muestras

- Queso entero: Para llevar a cabo la toma de muestras nos ayudamos de un cuchillo de grandes dimensiones (de los denominados de cortar jamon), con el que se trocearon los quesos en distinta forma según el tipo de inoculación llevado a cabo y los resultados que se iban obteniendo.

- Porciones: En aquellos casos en que el crecimiento alcanzado por el hongo aflatoxicogénico era abundante, antes de realizar el procesado de la muestra, se inactivaba el hongo rociándolo con cloroformo.

En el caso de la porción T6, tras 6 días de incubación, y con un crecimiento no abundante aunque sí visible,, se dividió en 2: T6-A, para extraer en ese momento, y T6-B que se dejó incubar hasta los 13 días.

La porción T7 se incubó a 28°C durante 20 días, al término de los cuales se inactivó el hongo rociándolo con cloroformo, y se cortó en dos porciones de aproximadamente 25 g: T7-A se extrajo para aflatoxinas tal y como estaba, es decir, junto con el micelio crecido sobre ella. En T7-B se eliminó el micelio totalmente, para lo cual se profundizaba en la porción de queso, quedando al final de esta operación una porción de 8.6 g, sin resto de micelio de ningún tipo. La capa de queso eliminada era de unos 5 mm.

- Triturado de queso: En aquellos casos con abundante crecimiento fúngico, al igual que en el caso anterior, se roció la superficie con cloroformo para inactivar el hongo. Posteriormente se recogió el substrato con la ayuda de una cucharilla hasta completar los 50 g necesarios para cada extracción.

- Pasta de queso: Una vez cumplido el periodo de incubación, se procedía a la separación de micelio y substrato, para lo cual, dado el crecimiento compacto del

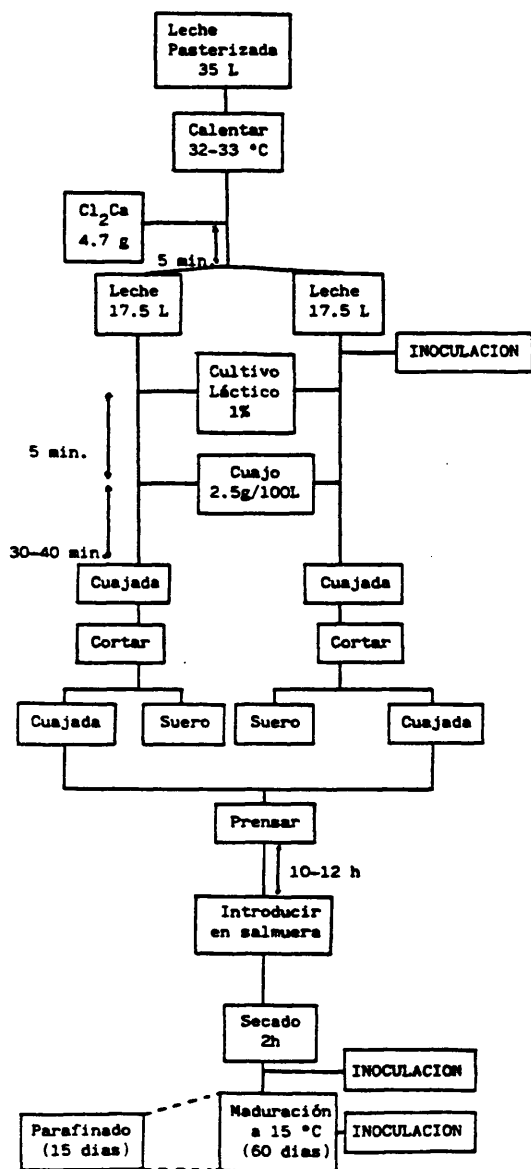
hongo, se tomaba el micelio con unas pinzas, y se llevaba a extraer según la técnica de Shih y Marth (333) ya descrita en II.7.b. Por otra parte, se tomaban 50 g del substrato, que se extraían para aflatoxinas.

#### II.9.c. Determinación de aflatoxinas

Todas las muestras de queso obtenidas en la forma descrita, ya fuera queso entero, macerado o pasta de queso, se extrajeron para aflatoxinas según la Técnica propia II ya descrita en II.5.g.

En la figura II.8 podemos seguir el proceso de elaboración del queso Madurado con los distintos puntos en que se llevó a cabo la inoculación de la cepa aflatoxicogénica.

Figura II.8 .- Esquema del proceso de elaboración del queso Madurado con indicación de las etapas en que se llevó a cabo la inoculación de la cepa aflatoxicogénica



## II.10. INFLUENCIA DEL PROCESADO DEL QUESO MADURADO SOBRE SU CONTENIDO EN AFLATOXINAS

### II.10.a. Introducción

El objeto de nuestros estudios era determinar la evolución que sufrían las aflatoxinas presentes en leche cuando ésta se destina a la fabricación de queso Madurado, incluyendo el propio proceso de elaboración, periodo de maduración y periodo de almacenamiento en distintas condiciones. Nuestros estudios no se limitaron a la aflatoxina  $M_1$ , presente en leche a través de la metabolización de  $B_1$  por animales en periodo de lactación, sino que abarcaron también las 4 aflatoxinas principales, por la posibilidad de utilización de leche concentrada para enriquecer la leche de partida para elaboración de queso, y sobre la que podría haberse desarrollado una cepa aflatoxicogénica dando lugar a la producción de  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$ , y  $G_2$ .

La contaminación de la leche con las aflatoxinas se llevaba a cabo de forma artificial durante el proceso de elaboración del queso tras la adición a la leche del cloruro cálcico.

Se elaboraron 2 lotes de queso para estos estudios: uno de ellos se procesó siguiendo los pasos tradicionales descritos en el apartado II.9.a. Para el otro lote se incorporó una pequeña variante, consistente en que una vez añadido el

starter a la leche, se dejaba reposar durante 30 minutos, lo que se traducía en una mayor acidificación.

Describiremos a continuación de forma separada los procesos seguidos para cada uno de los 2 lotes.

#### II.10.b. Lote 1

##### II.10.b.1. Contaminación de la leche

Como solución contaminante utilizamos aflatoxinas patrón ( $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$ ,  $G_2$  y  $M_1$ ) en cloroformo. Este cloroformo se incorporaba a un tubo de centrífuga de 10 ml, donde con la ayuda del dispositivo descrito en II.5.c.1. (concentración en rotavapor), que suministra aire a presión, se procedía a su evaporación a sequedad.

El tubo de centrífuga era sometido a sucesivos lavados con una solución de bicarbonato sódico al 1% hasta completar 50 ml; las cantidades obtenidas en los sucesivos lavados se iban incorporando a un matraz ehrlenmeyer de 100 ml.

De los 50 ml obtenidos, se tomaba 1 ml con la ayuda de una pipeta, que era utilizado para determinación de aflatoxinas. Los 49ml restantes se añadían a los 17.5 L de leche más cloruro cálcico en el contenedor. Se homogeneizaba con la ayuda de un cucharón de latón, y se añadía el starter.

En este momento se detenía el proceso durante 30 minutos, con lo que se conseguía una mayor acidificación de la leche.

Cumplido este tiempo, se continuaba en la forma ya descrita, recogiendo muestras de suero y cuajada para su posterior análisis de aflatoxinas, y de esta forma determinar su distribución durante el proceso de elaboración del queso.

En estos estudios se obtuvieron los quesos: Q16 (685g) y Q17 (849g). Tras 15 días de maduración a 15°C se procedió a su parafinado.

El periodo de maduración completo fue de 60 días.

#### II.10.b.2. Estudios efectuados

1/ Influencia de las aflatoxinas sobre las bacterias presentes en leche y starter:

- Técnica de Recuento bacteriano: Con objeto de determinar la posible influencia de las aflatoxinas sobre la flora bacteriana de la leche y sobre el starter, se tomaron muestras para su posterior recuento bacteriano de: leche original, leche tras añadir el cuajo, suero y cuajada.

La técnica seguida para llevar a cabo esta determinación era distinta según se tratara de substratos líquidos o de cuajada. Así, en el primer caso (leche y suero) se tomaba 1 ml del producto a analizar con la ayuda de una pipeta digital estéril. Se suspendía en 9 ml de agua de peptona al 1% con Tween 80, con lo que teníamos hecha la dilución 1/10, ó  $10^{-1}$ . A partir de ésta, se continuaban haciendo diluciones

decimales, también en agua de peptona al 1% con Tween 80, hasta la  $10^{-6}$ . De cada una de las diluciones se depositaban 100  $\mu$ l sobre la superficie del medio de recuento propuesto por Nuñez y descrito en II.1.g., extendiéndose en su superficie con la ayuda del asa de Drigalski.

En el caso de la cuajada bien exprimida, considerada como queso, se tomaban 2g, que se incorporaban a un contenedor estéril de plástico de 40 ml de capacidad, al que se añadían 18 ml de agua de peptona al 1% con Tween 80, tras lo cual se congelaba. Unas tres o cuatro horas después, se extraía del congelador, y dentro del mismo recipiente se trituraba, antes de que se descongelara, con una espátula de acero inoxidable esterilizada a la llama, de forma que se produjera una suspensión pulverulenta. Una vez descongelada, se tomaba 1 ml y se procedía a realizar las diluciones y la siembra en la forma ya indicada para leche y suero.

Las placas con el medio de cultivo sembrado se incubaban a 37 °C durante 48 horas, pasando a contar el número de colonias en aquellas placas donde el número de las mismas se encontraba entre 30 y 300.

Todos los recuentos se efectuaron siempre por duplicado.

Estas determinaciones fueron realizadas a lo largo del proceso de elaboración de dos quesos controles, siguiendo esta misma metodología.



2/ Influencia del proceso de elaboración del queso Madurado sobre las aflatoxinas presentes en la leche de partida:

- Determinación de aflatoxinas: Se llevó a cabo dicho análisis en la solución de aflatoxinas en bicarbonato, leche tras la contaminación, suero y cuajada final bien exprimida. Asimismo, 50 ml. de la leche original fueron analizadas para comprobar la ausencia de aflatoxinas en la misma. Todas estas determinaciones, con excepción de la relativa a la solución contaminante, fueron efectuadas por triplicado.

1 ml de la solución de aflatoxinas en bicarbonato al 1% fueron extraídas 3 veces con 25 ml de cloroformo cada vez.

La determinación en leche y suero se hizo siguiendo la técnica propia para la leche descrita en II.5.g.

La cuajada, bien exprimida para eliminar en la misma el máximo posible de suero, fue analizada según la técnica propia indicada para el queso en II.5.g.

3/ Influencia del periodo de maduración del queso Madurado sobre las aflatoxinas presentes en el mismo:

Para llevar a cabo estos estudios, se tomaron muestras de los quesos a lo largo del periodo de maduración, que posteriormente eran analizadas para determinar su contenido en aflatoxinas.

Para la toma de muestras nos servimos de un cuchillo, con el

cual íbamos troceando el queso. Dicha toma de muestras se efectuó en los siguientes días de maduración:

- 15 días: 2 muestras del queso Q16.

- 30 días: 2 muestras del queso Q17.

- 60 días: 2 muestras de cada uno de los 2 quesos, Q16 y Q17, haciendo diferenciación entre porción interna y externa de las mismas. De esta forma se obtuvieron dos porciones internas (de 55.6g y 47.4g respectivamente), y dos externas (de 49g y 51.6g).

4/ Influencia del almacenamiento en refrigeración de queso Madurado sobre las aflatoxinas presentes en el mismo:

Una vez cumplidos los 60 días de maduración, una porción de cada uno de los quesos Q16 y Q17 se envolvió en papel de aluminio y se llevó a refrigeración a 4°C, efectuando toma de muestras a partir de las mismas tras distintos periodos de tiempo, haciendo distinción entre porción interna y externa:

- 15 días: queso Q16:

  - Externa (30g).

  - Interna (44.6g).

- 30 días: queso Q17:

  - Externa (46.9g).

  - Interna (43.2g).

- 60 días: queso Q17:

  - Externa (45.7g).

  - Interna (44.9g).

5/ Influencia del almacenamiento en congelación del queso Madurado sobre las aflatoxinas presentes en el mismo:

Trascurridos 30 días de maduración, se corta una porción del queso Q17, troceándose en lonchas, que se envuelven en papel de aluminio y se llevan a congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ , procediendo a su análisis para aflatoxinas tras distintos periodos de tiempo:

- Porción D-1 (81g): 24 horas.
- " D-2 (49.6g): 10 días.
- " D-3 (50.3g): 30 días.
- " D-4 (50g): 60 días.

#### 11.10.c. Lote 2

Se llevó a cabo el estudio de un nuevo lote de leche con objeto de complementar las experiencias anteriores, fundamentalmente en el sentido de la influencia que la refrigeración y congelación del queso Madurado podría tener sobre las aflatoxinas presentes en el mismo.

El proceso de elaboración seguido fue el ya descrito, con la diferencia con respecto al Lote 1 de que se partió de 20 L de leche y que no se mantuvo ese margen de 30 minutos de espera

antes de añadir el cuajo. De esta forma se investigaba la influencia que la acidificación de la leche pudiera tener sobre la distribución de aflatoxinas entre suero y cuajada.

En este lote se obtuvieron los quesos Q18 (869g) y Q19 (984g).

La contaminación de la leche se efectuó en la forma indicada para el Lote 1, llevándose a cabo los siguientes estudios:

1/ Influencia del proceso de elaboración del queso Madurado sobre las aflatoxinas presentes en la leche de partida:

Se procedió a la determinación de aflatoxinas en: leche tras la contaminación, suero y cuajada final bien exprimida. Asimismo, 50 ml de la leche original fueron analizadas para comprobar la ausencia de aflatoxinas en la misma. La metodología seguida en cada caso fue la ya indicada para el Lote 1.

2/ Influencia del periodo de maduración del queso Madurado sobre las aflatoxinas presentes en el mismo:

A los 15 días de madurado se procedió al parafinado de los quesos.

Se realizó una única toma de muestras de cada uno de los quesos, una vez concluido el periodo de maduración (60 días), a partir de Q18 (28.9g) y Q19 (29g).

3/ Influencia del almacenamiento en refrigeración del queso Madurado sobre las aflatoxinas presentes en el mismo:

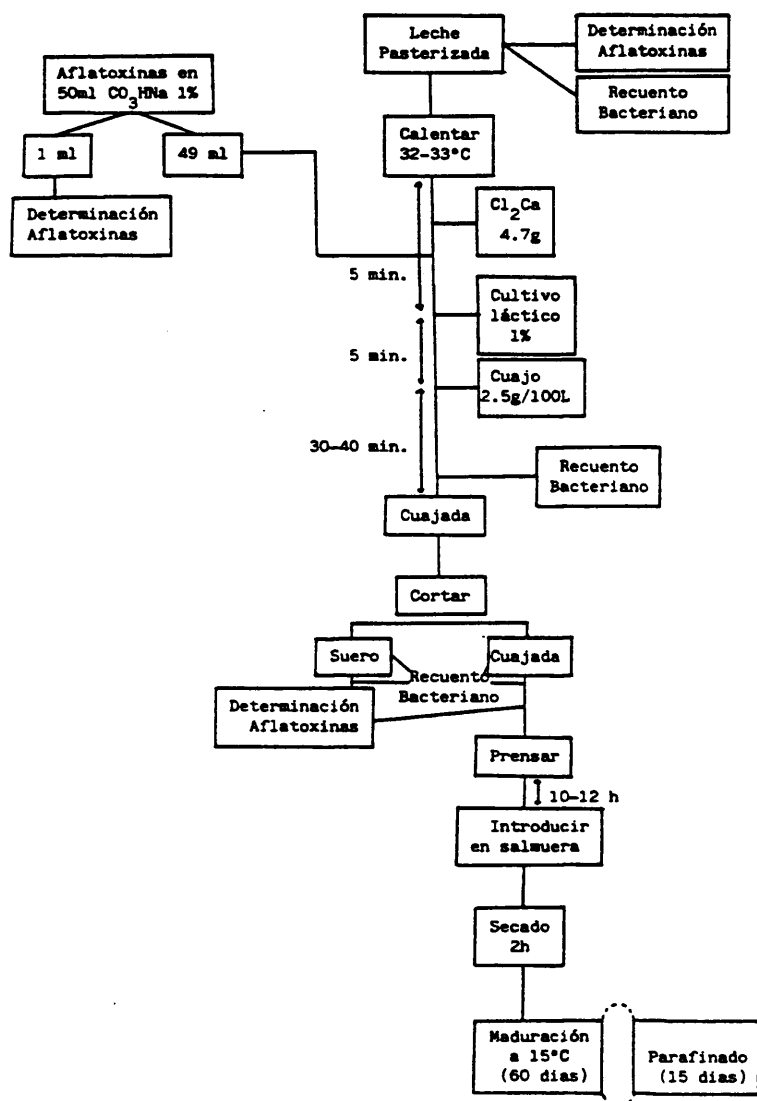
Se siguieron los pasos ya indicados para el Lote 1, haciendo extracción de cada uno de los quesos a los 30, 60 y 90 días.

4/ Influencia del almacenamiento en congelación del queso Madurado sobre las aflatoxinas presentes en el mismo:

Se siguió la misma metodología que para el Lote 1, llevando a cabo la toma de muestras de cada uno de los 2 quesos a los 30, 60 y 90 días.

En la figura 11.9 se esquematiza el proceso de elaboración del queso Madurado, con los estudios efectuados sobre la influencia que dicho proceso tiene sobre las aflatoxinas.

Figura II.9 .- Proceso de elaboración del queso Madurado con los estudios realizados de influencia sobre las aflatoxinas presentes en la leche de partida



### III. RESULTADOS

### III.1. TECNICAS DE DETERMINACION DE AFLATOXINAS EN LECHE Y PRODUCTOS LACTEOS

Para llevar a cabo el estudio de la presencia de aflatoxina M<sub>1</sub> en leche se requería una técnica con un bajo límite de detección, que asegurara a su vez un alto grado de recuperación; a estos 2 factores fundamentales, podríamos añadir otros 2, que si no vitales, no conviene olvidar, como son la rapidez de la técnica, y el gasto de materiales y reactivos que lleva implícito, factores que serán analizados detenidamente dentro del capítulo correspondiente de la discusión.

Como hemos indicado dentro del capítulo II.5. de Material y Métodos, al iniciar nuestros estudios fueron probadas distintas técnicas con objeto de calibrar su utilidad en nuestras investigaciones.

En la tabla III.1 podemos apreciar los resultados obtenidos por nosotros al utilizar estas técnicas, y que se resume en unos porcentajes de recuperación del 93% en la técnica de Lafont et al. (193), del 92.1% en la de Tripet et al. (368) y del 80.8% en la de Stubblefield (353).

La técnica que describimos como propia fue probada en sus 2 variantes (Técnica I y II) para los 3 productos lácteos objeto de nuestro estudio, leche, yogur y queso madurado, en



Tabla III.1 .- Resultados obtenidos con la utilización de las técnicas de determinación de aflatoxinas de distintos autores

Técnica	Nº muestras efectuadas	A F L A T O X I N A M <sub>1</sub>					
		Añadida (µg/L)	Recuperada (media) (µg/L)	Rango (µg/L)	Rango (%)	% Recuperada	
						$\bar{x}$	desviación standard
Lafont et al.	5	0.5	0.465	0.4 - 0.52	80 - 104	93	9
Tripet et al.	5	0.5	0.46	0.41- 0.49	82 - 99	92.1	6.71
Stubblefield	5	0.5	0.403	0.33- 0.46	66 - 92	80.8	9.88

cuanto a su efectividad para la recuperación de aflatoxina  $M_1$ , como podemos apreciar en las tablas III.2 y III.3. En ambos casos, la técnica se mostró más efectiva en leche que en yogur y queso, si bien manteniendo un alto grado de recuperación en los 3 productos lácteos. En la Técnica I las recuperaciones son del 94.4% en leche, 92.8% en yogur y 84.75% en queso. Para la Técnica II estos porcentajes son del 97.25% en leche, 93.12% en yogur y 88.12% en queso.

Asimismo, la Técnica II fue estudiada en cuanto a la recuperación de aflatoxina  $B_1$ , no sólo en yogur y queso, sino también en leche, como se puede apreciar en la tabla III.4. Las medias de las recuperaciones fueron de 98.46% en leche, 96.05% en yogur y 91.06% en queso.

En cuanto al límite de detección, fue calculado para  $M_1$ , y se estableció en 0.02 ppb para leche y yogur, y 0.05 ppb para queso, en ambos casos siguiendo la Técnica I; y para la Técnica II en 0.1 ppb en leche y yogur, y 0.4 ppb en queso.

Tabla III.2 .- Recuperación de aflatoxina M<sub>1</sub> a partir de distintos productos lácteos utilizando la Técnica I

Alimento	Nº muestras efectuadas	A F L A T O X I N A M <sub>1</sub>				
		Añadida (µg/L-Kg)	Recuperada (media) (µg/L-Kg)	Rango (µg/L-Kg)	Rango (%)	% Recuperada
						$\bar{x}$ Desviación standard
Leche	12	0.2	0.168	0.16 - 0.2	82 - 104	94.4      5.71
Yogur	8	0.2	0.185	0.16 - 0.19	84 - 99	92.8      5.28
Queso	8	0.5	0.423	0.36 - 0.49	73 - 98	84.75      7.72

Tabla III.3 .- Recuperación de aflatoxina  $M_1$  a partir de distintos productos lácteos utilizando la Técnica II

Alimento	Nº muestras efectuadas	A F L A T O X I N A $M_1$				% Recuperada	
		Añadida ( $\mu\text{g/L-Kg}$ )	Recuperada (media) ( $\mu\text{g/L-Kg}$ )	Rango ( $\mu\text{g/L-Kg}$ )	Rango (%)	$\bar{x}$	Desviación standard
Leche	12	0.2	0.194	0.17 - 0.21	89 - 106	97.25	3.91
Yogur	8	0.2	0.186	0.16 - 0.20	83 - 102	93.125	6.1
Queso	8	0.5	0.440	0.37 - 0.48	75 - 96	86.125	7.92

Tabla III.4 .- Recuperación de aflatoxina B<sub>1</sub> a partir de distintos productos lácteos utilizando la Técnica II

		A F L A T O X I N A B <sub>1</sub>				
Alimento	Nº muestras efectuadas	Añadida (µg/L-Kg)	Recuperada (media) (µg/L-Kg)	Rango (µg/L-Kg)	Rango (%)	% Recuperada
						$\bar{x}$ Desviación standard
Leche	8	1	0.984	0.91 - 1.04	91.5 - 104.2	98.4 3.8
Yogur	6	1	0.96	0.90 - 1.02	90.3 - 102	96.05 4.61
Queso	6	1	0.91	0.85 - 0.97	85 - 97	91.06 5.34

### III.2. DETERMINACION DE AFLATOXINAS EN MUESTRAS DE LECHE COMERCIAL

En la tabla III.5 podemos apreciar los resultados obtenidos para cada una de las muestras analizadas, indicando la fecha de su procesamiento por parte de la Central Lechera. Estos resultados han sido agrupados por meses como puede apreciarse en la tabla III.6, y por estaciones, en la tabla III.7. Dentro de la columna de muestras dudosas se incluyen aquellas en que la presencia o ausencia de aflatoxina  $M_1$  no pudo ser confirmada de modo terminante, persistiendo como dudosa después de los 2 análisis efectuados. Consideramos que estas muestras corresponden a aquellas en que la  $M_1$  se encuentra en cantidades traza.

Los mayores porcentajes de muestras positivas a  $M_1$  se produjeron en los meses de Mayo (4), Noviembre (3) y Diciembre (3). Apareció una muestra positiva en cada uno de los meses de Abril, Julio y Agosto. Hubo 4 muestras de las denominadas dudosas en los meses de Enero, Abril, Julio y Octubre.

Agrupado por estaciones, el mayor número de muestras positivas aparece en Primavera (5) y en Otoño (4). En Invierno y Verano son 2 las muestras positivas en cada una de las estaciones.

Tabla III.5 .- Muestras de leche comercial analizadas a lo largo de 1985 para presencia de aflatoxina M<sub>1</sub> y su nivel en las muestras positivas

Muestra	Fecha	Presencia de aflatoxinas	Nivel
L-1	2 - Enero	Negativa	0.02 ppb
L-2	8 - Enero	Negativa	
L-3	14 - Enero	Dudosa	
L-4	21 - Enero	Positiva	
L-5	28 - Enero	Negativa	
L-6	1 - Febrero	Negativa	
L-7	7 - Febrero	Negativa	
L-8	14 - Febrero	Negativa	
L-9	21 - Febrero	Negativa	
L-10	28 - Febrero	Negativa	
L-11	1 - Marzo	Negativa	0.022 ppb
L-12	7 - Marzo	Negativa	
L-13	13 - Marzo	Negativa	
L-14	21 - Marzo	Negativa	
L-15	28 - Marzo	Negativa	
L-16	1 - Abril	Negativa	
L-17	8 - Abril	Dudosa	
L-18	15 - Abril	Negativa	
L-19	22 - Abril	Positiva	
L-20	29 - Abril	Negativa	
L-21	2 - Mayo	Positiva	0.08 ppb
L-22	9 - Mayo	Negativa	0.02 ppb
L-23	16 - Mayo	Positiva	
L-24	22 - Mayo	Positiva	

Tabla III.5 .- (Continuación)

Muestra	Fecha	Presencia de aflatoxinas	Nivel
L-25	30 - Mayo	Positiva	0.0258 ppb
L-26	1 - Julio	Negativa	
L-27	8 - Julio	Negativa	
L-28	15 - Julio	Positiva	0.04 ppb
L-29	22 - Julio	Negativa	
L-30	27 - Julio	Dudosa	
L-31	6 - Agosto	Positiva	0.032 ppb
L-32	12 - Agosto	Negativa	
L-33	17 - Agosto	Negativa	
L-34	23 - Agosto	Negativa	
L-35	30 - Agosto	Negativa	
L-36	14 - Octubre	Dudosa	
L-37	21 - Octubre	Negativa	
L-38	28 - Octubre	Negativa	
L-39	4 - Noviembre	Positiva	0.02 ppb
L-40	11 - Noviembre	Negativa	
L-41	18 - Noviembre	Positiva	0.022 ppb
L-42	25 - Noviembre	Positiva	0.05 ppb
L-43	4 - Diciembre	Negativa	
L-44	9 - Diciembre	Positiva	0.04 ppb
L-45	16 - Diciembre	Negativa	
L-46	23 - Diciembre	Positiva	0.1 ppb
L-47	30 - Diciembre	Positiva	0.022 ppb



Tabla III.6 .- Distribución de las muestras de leche comercial analizadas por meses y su nivel de contaminación con aflatoxina M<sub>1</sub>

Mes	Nº muestras	Negativas	Dudosas (Trazas)	Positivas	Nivel de Contaminación (ppb)
Enero	5	3	1	1	0.02
Febrero	5	5	-	-	-
Marzo	5	5	-	-	-
Abril	5	3	1	1	0.025
Mayo	5	1	-	4	0.02, 0.025, 0.032, 0.08
Julio	5	3	1	1	0.04
Agosto	5	4	-	1	0.032
Octubre	3	2	1	-	
Noviembre	4	1	-	3	0.02, 0.025, 0.05
Diciembre	5	2	-	3	0.025, 0.04, 0.1
Total	47	29	4	14	0.02 a 0.1
En %	100	61.7	8.5	29.8	

Tabla III.7 .- Distribución de muestras de leche comercial analizadas por estación del año, y su nivel de contaminación con aflatoxina  $M_1$

Estación	Nº Muestras	Negativas	Dudosas (Trazas)	Positivas	Nivel de Contaminación
Invierno	16	12	2	2	0.022, 0.1
Primavera	11	5	1	5	0.02, 0.022, 0.025, 0.032, 0.08
Verano	10	7	1	2	0.032, 0.04
Otoño	10	5	1	4	0.02, 0.022, 0.04, 0.05

- 242 -

El nivel máximo de aflatoxinas detectado se determinó en una muestra del mes de Diciembre, con 0.1 ppb, si bien debemos señalar que ésta fue la excepción, junto con otra que presentaba 0.08 ppb (en Mayo), y otra con 0.05 ppb (en Noviembre); el resto de muestras positivas se mantuvo en los límites de 0.02 a 0.04 ppb.

### III.3. PRODUCCION DE AFLATOXINAS SOBRE YOGUR

#### III.3.a. Producción de aflatoxinas sobre yogur comercial

##### III.3.a.1. Incubación en envase dañado a 28°C

A las 24h de inoculación no se apreció ningún signo de crecimiento fúngico. A las 36h comenzaban a aparecer pequeños filamentos apenas visibles; al proceder a la extracción de aflatoxinas sólo se obtuvieron cantidades traza de B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub>. A las 48h los filamentos eran más abundantes aunque se confundían con la superficie del yogur; su crecimiento no compacto impidió la separación de micelio y sustrato, con lo cual la extracción para aflatoxinas se efectuó en ambos de forma conjunta.

En la tabla III.B se puede apreciar el grado de alteración del yogur, el grado de esporulación y el peso de micelio seco en mg obtenidos para cada uno de los días de incubación estudiados. El grado de alteración del yogur se va haciendo más evidente conforme se incrementa el periodo de incubación. Lo mismo sucede con el grado de esporulación, con la excepción de que a los 8 días es menor que en los días 6 y 7. El peso de micelio seco también va sufriendo un incremento progresivo, si bien a los 4 días es inferior al detectado a

Tabla III.8 .- Producción de aflatoxinas sobre yogur comercial con incubación en envase dañado a 28°C. Grado de alteración del yogur, esporulación y peso de micelio seco

Periodo incubación en días	Alteración del yogur (a)	Esporulación (b)	Peso micelio seco en mg
2	0	0	(A)
3	+	0	725
4	+	0	483
5	++	+	1647
6	+++	++	1736
7	+++	++	1865
8	+++	+	2230
9	++++	++	3125
10	++++	+++	3651
15	++++	+++	6145
20	++++	++++	7645

- (a) .- 0:nula; +:pequeños filamentos apenas visibles; ++:micelio cubre toda la superficie con color amarillo del sustrato; +++:aparece abundante líquido; ++++: muy abundante crecimiento, muy abundante color amarillo y muy abundante líquido.
- (b) .- Se mide el grado de esporulación de 0 a ++++ considerando las zonas del micelio que están esporulando.
- (A) .- No se aprecia crecimiento, por lo que no se puede separar micelio, aunque se extrae del sustrato.

los 3 días.

En la tabla III.9 se muestra la cantidad de las distintas aflatoxinas detectadas en el micelio y expresadas en forma de  $\mu\text{g}$  en la totalidad del micelio, así como por cada gramo del mismo. En valores en todo el micelio la producción de aflatoxinas presenta oscilaciones periódicas, con disminución de los niveles detectados en los días 4, 8 y 15. Esto mismo sucede cuando la determinación se hace por gramo de micelio.

En la tabla III.10 se presentan los niveles de aflatoxinas detectados en el yogur, expresados por 50 g y por cada gramo del mismo. En este caso a diferencia de lo que sucedía con el micelio, únicamente se aprecia una disminución del nivel de aflatoxinas detectadas a lo largo del periodo de incubación a los 8 días, no apreciándose a los 4 y 15 como sucedía en el micelio.

Son de destacar los resultados obtenidos a los 2 días, por cuanto si bien el nivel de aflatoxina total detectado es bajo ( $0.78 \mu\text{g}/50\text{g}$ ), debe tenerse en cuenta que el aspecto del yogur era completamente normal, no apreciándose ningún tipo de alteración en su superficie indicativa del crecimiento fúngico.

En la tabla III.11 se representan los porcentajes de cada una de las aflatoxinas producidas en micelio y sustrato. Con respecto al micelio, la aflatoxina  $M_1$  es la que se produce siempre en menor medida, mientras que el grado de  $B_1:G_1$  va

Tabla III.9 .- Producción de aflatoxinas sobre yogur comercial con incubación en envase dañado a 28°C.  
Determinación de aflatoxinas en micelio

Período de incubación en días	AFLATOXINAS											
	$\mu\text{g} / \text{micelio total}$						$\mu\text{g} / \text{g micelio}$					
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total
2 *	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	80	2.5	80	2.5	1.4	166.4	110.34	3.44	110.34	3.44	1.93	229.49
4	40	3.3	40	3.3	2.85	89.45	82.8	6.83	82.8	6.83	5.90	185.16
5	200	10	200	10	5	425	121.4	6.07	121.4	6.07	3.03	257.97
6	640	35	640	35	25	1375	368.6	20.16	368.6	20.16	14.40	791.92
7	1000	25	500	25	15	1565	536.19	13.4	268	13.4	8.04	839.03
8	340	5.8	340	5.8	1.4	693	152.46	2.6	152.4	2.6	0.62	310.68
9	670	45	1200	45	30	1990	214.4	14.4	384	14.4	9.6	636.8
10	2000	100	2000	100	13.3	4213.3	547.79	27.3	547.79	27.3	3.64	1153.82
15	500	40	500	40	12.5	1092.5	81.3	6.5	81.3	6.5	2.03	177.83
20	1770	155	1770	155	88	3938	231.5	20.2	231.5	20.2	11.5	515.1

Periodo de Incubación en días	AFLATOXINAS											
	µg / 50g substrato						µg / g substrato					
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total
2	0.5	0.08	0.1	0.08	0.02	0.78	0.01	0.0016	0.002	0.0016	0.0004	0.0156
3	57.14	4	80	4	4	149.14	1.1428	0.08	1.6	0.08	0.08	2.9828
4	133.3	14	200	14	4	365.3	2.66	0.28	4	0.28	0.08	7.3
5	400	20	500	20	20	960	8	0.4	10	0.4	0.4	19.2
6	640	65	640	65	50	1460	12.8	1.3	12.8	1.3	1	29.2
7	670	40	800	50	50	1610	13.4	6.8	16	1	1	38.2
8	400	28.5	750	28.5	10	1217	8	0.57	15	0.57	0.2	24.34
9	670	120	1200	120	120	2230	13.4	2.4	24	2.4	2.4	44.6
10	1350	67	1350	67	67	2901	27	1.34	27	1.34	1.34	58.02
15	1000	200	1350	400	67	3017	20	4	27	8	1.34	60.34
20	1800	149	2000	180	90	4219	36	2.98	40	3.6	1.8	84.38



Tabla III.11 .- Producción de aflatoxinas sobre yogur comercial con incubación en envase sellado a 28°C.  
Porcentaje de aflatoxinas producidas en micelio/yogur

Periodo de incubacion en dias	AFLATOXINAS EN MICELIO			AFLATOXINAS EN SUBSTRATO		
	B <sub>1</sub> / B <sub>2</sub> / G <sub>1</sub> / G <sub>2</sub> / M <sub>1</sub>	B / G / M	B <sub>1</sub> : G <sub>1</sub>	B <sub>1</sub> / B <sub>2</sub> / G <sub>1</sub> / G <sub>2</sub> / M <sub>1</sub>	B / G / M	B <sub>1</sub> : G <sub>1</sub>
2	-	-	-	25 / 4 / 5 / 4 / 1	3.2/ 1 / 0.11	5 : 1
3	57.1/ 1.78/57.1/ 1.78/ 1	1 / 1 / 0.016	1 : 1	14.2/ 1 / 20 / 1 / 1	1 /1.37/0.06	1 : 1.
4	14 / 1.15/ 14 / 1.15/ 1	1 / 1 / 0.065	1 : 1	33.3/ 3.5 / 50 / 3.5 / 1	1 /1.45/0.02	1 : 1.
5	40 / 2 / 40 / 2 / 1	1 / 1 / 0.02	1 : 1	20 / 1 / 25 / 1 / 1	1 /1.23/0.04	1 : 1.
6	25.6/ 1.4 / 25.6/ 1.4 / 1	1 / 1 / 0.037	1 : 1	12.8/ 1.3 /12.8/ 1.3/ 1	1 / 1 / 0.07	1 : 1
7	66.6/ 1.6 / 33.3/ 1.6 / 1	1.95/ 1 / 0.028	2 : 1	16.7/ 1 / 20 / 1.25/1.25	1 / 1.19/0.07	1 : 1.
8	242.8/ 4.14/242.8/ 4.14/ 1	1 / 1 / 0.004	1 : 1	40 / 2.85/ 75 / 2.85/ 1	1 / 1.81/0.02	1 : 1.
9	22.3/ 1.5 / 40 / 1.5 / 1	1 /1.74/0.041	1 : 1.79	5.58/ 1 / 10 / 1 / 1	1 / 1.75/ 0.15	1 : 1.
10	150.3/ 7.51/150.3/ 7.51/ 1	1 / 1 /0.0063	1 : 1	20.1/ 1 / 20.1/ 1 / 1	1 / 1 / 0.047	1 : 1
15	40 / 3.2 / 40 / 3.2 / 1	1 / 1 / 0.023	1 : 1	14.02/ 2.98/ 20.1/ 5.97/ 1	1 / 1.23/0.047	1: 1.3
20	20.1/ 1.7 / 20.1/ 1.7 / 1	1 / 1 / 0.045	1 : 1	20 / 1.65/ 22.2/ 2 / 1	1 / 1.11/0.046	1 : 1.

paralelo al de B:G, siendo en la mayor parte de los casos 1:1, excepto a los 7 días, en que está inclinado hacia la aflatoxina B y a los 9 días en que sucede lo contrario. En el substrato, tras un primer predominio de B<sub>1</sub> a los 2 días, a partir del 32 se muestra ligeramente inclinado hacia la aflatoxina G<sub>1</sub>.

En la tabla III.12 se indica el porcentaje de distribución de las distintas aflatoxinas en micelio total/50g substrato por una parte, y g micelio/ g substrato por otra. En el primer caso se obtienen valores oscilantes, con porcentajes superiores en el substrato en los días 4, 5, 8 y 15, mientras que en el resto de los días los valores resultaron ser equiparables en micelio y substrato. Cuando la determinación se hace por gramo de micelio y substrato, el porcentaje de aflatoxinas detectado es siempre claramente favorable al micelio.

#### III.3.a.2. Incubación en envase intacto a 28°C

Los primeros signos de desarrollo fúngico fueron apreciados a los 7 días, en forma de una delgada membrana blanquecina, que se confundía con la superficie del yogur. A pesar de este ligero desarrollo, se pudo llevar a cabo la separación de esta fina membrana para proceder a la extracción de aflatoxinas de la misma.

Tabla III.12 .- Producción de aflatoxinas sobre yogur comercial con incubación en envase sellado a 28°C.  
Distribución de aflatoxinas en micelio/substrato

	AFLATOXINAS EN micelio total / 50g substrato						AFLATOXINAS EN g micelio / g substrato					
	B <sub>1</sub> : B <sub>2</sub>	B <sub>2</sub> : B <sub>1</sub>	G <sub>1</sub> : G <sub>2</sub>	G <sub>2</sub> : G <sub>1</sub>	M <sub>1</sub> : M <sub>2</sub>	T : T	B <sub>1</sub> : B <sub>2</sub>	B <sub>2</sub> : B <sub>1</sub>	G <sub>1</sub> : G <sub>2</sub>	G <sub>2</sub> : G <sub>1</sub>	M <sub>1</sub> : M <sub>2</sub>	T : T
3	1.39 : 1	1 : 1.6	1 : 1.6	1 : 1.6	1 : 2.85	1.11 : 1	96.5 : 1	43 : 1	68.9 : 1	43 : 1	24.1 : 1	76.9 : 1
4	1 : 3.33	1 : 4.24	1 : 5	1 : 4.24	1 : 1.4	1 : 4.08	31.1 : 1	24.3 : 1	20.7 : 1	24.3 : 1	73.7 : 1	25.3 : 1
5	1 : 2	1 : 2	1 : 2.5	1 : 2	1 : 4	1 : 2.25	15.1 : 1	15.1 : 1	12.1 : 1	15.1 : 1	7.57 : 1	13.4 : 1
6	1 : 1	1 : 1.85	1 : 1	1 : 1.85	1 : 2	1 : 1.06	28.7 : 1	15.5 : 1	28.7 : 1	15.5 : 1	14.4 : 1	27.1 : 1
7	1.49 : 1	1 : 1.6	1 : 1.6	1 : 2	1 : 3.3	1 : 1.02	40 : 1	1.97 : 1	16.7 : 1	13.4 : 1	8.04 : 1	21.9 : 1
8	1 : 1.17	1 : 4.91	1 : 2.2	1 : 4.91	1 : 7.14	1 : 1.75	19 : 1	4.56 : 1	10.1 : 1	4.56 : 1	3.1 : 1	12.7 : 1
9	1 : 1	1 : 2.65	1 : 1	1 : 2.65	1 : 4	1 : 1.12	16 : 1	6 : 1	16 : 1	6 : 1	4 : 1	14.2 : 1
10	1.48 : 1	1.49 : 1	1.48 : 1	1.49 : 1	1 : 5.03	1.45 : 1	20.2 : 1	20.3 : 1	20.2 : 1	20.3 : 1	2.7 : 1	19.8 : 1
15	1 : 2	1 : 5	1 : 2.7	1 : 10	1 : 5.36	1 : 2.76	4.06 : 1	1.62 : 1	3.01 : 1	1 : 1.23	1.51 : 1	2.94 : 1
20	1 : 1.01	1.04 : 1	1 : 1.12	1 : 1.16	1 : 1.02	1 : 1.07	6.43 : 1	6.77 : 1	5.78 : 1	5.6 : 1	6.38 : 1	6.1 : 1

Como se indica en la tabla III.13, no se apreció esporulación a lo largo de los 15 días de incubación. El peso de micelio seco se va incrementando a lo largo de la incubación.

Como podemos apreciar en las tablas III.14 y III.15, el nivel de aflatoxinas detectado tanto en micelio como en substrato se va incrementando a lo largo del periodo de incubación. Son de destacar los valores obtenidos a los 7 días (0.365 µg aflatoxina total en micelio + substrato) por cuanto el aspecto del yogur era totalmente normal.

En la tabla III.16 se muestra el porcentaje de cada una de las aflatoxinas producidas, tanto en micelio como en substrato. En el micelio se muestra una producción equitativa  $B_1 : G_1$  a lo largo de todo el periodo de incubación. En el substrato en cambio, se aprecian oscilaciones, siendo a los 7 días muy superior el nivel de  $B_1$ , mientras que a los 10 días lo es el de  $G_1$ . En todos los casos la aflatoxina  $M_1$  es la que se produce en menor medida.

En la tabla III.17 se presenta el grado de distribución de las aflatoxinas entre micelio y substrato. En el caso de micelio total/50g substrato, exceptuando a los 7 días en que el nivel es parejo en ambos, en el resto de las determinaciones se obtuvieron niveles muy superiores en el substrato. Cuando la determinación se hace por gramo de micelio y substrato, los valores de aflatoxinas siempre se muestran inclinados hacia el micelio, en un nivel muy elevado

Tabla III.13 .- Producción de aflatoxinas sobre yogur comercial con incubación en envase intacto a 28°C. Grado de alteración del yogur, esporulación y peso de micelio seco

Periodo de incubación en días	Alteración del yogur (a)	Esporulación (b)	Peso micelio seco en mg
7	0	0	33
8	+	0	234
10	+	0	673
15	++	0	974

- (a) .- 0:nula; +:pequeños filamentos apenas visibles; ++:micelio cubre toda la superficie con color amarillo del substrato; +++:aparece abundante liquido; ++++: muy abundante crecimiento, muy abundante color amarillo y muy abundante liquido.
- (b) .- Se mide el grado de esporulación de 0 a ++++ considerando las zonas del micelio que estan esporulando.

Tabla III.14 .- Producción de aflatoxinas sobre yogur comercial con incubación en envase intacto a 28°C.  
Determinación de aflatoxinas en micelio

Periodo de incubación en días	A F L A T O X I N A S											
	µg / micelio total						µg / g micelio					
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total
7	0.08	0.018	0.08	0.018	-	0.196	2.42	0.54	2.42	0.54	-	5.93
8	1	0.2	1	0.2	-	2.4	4.27	0.85	4.27	0.85	-	10.25
10	6.6	0.4	6.6	1.3	0.3	15.2	9.8	0.59	9.8	1.93	0.44	22.58
15	20	3.3	20	3.3	1	47.6	20.5	3.38	20.5	3.38	1.02	48.87

Tabla III.15 .- Producción de aflatoxinas sobre yogur comercial con incubación en envase intacto a 28°C.  
Determinación de aflatoxinas en yogur

Periodo de incubación en días	AFLATOXINAS											
	$\mu\text{g} / 50 \text{ g}$ substrato						$\mu\text{g} / \text{g}$ substrato					
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total
7	0.08	0.018	0.04	0.018	0.013	0.169	0.0016	0.00036	0.0008	0.00036	0.00026	0.0034
8	50	6.6	50	6.6	2.2	115.4	1	0.132	1	0.132	0.044	2.308
10	50	5.71	133	57.1	5.71	251.56	1	0.11	2.66	1.14	0.11	5.03
15	200	20	200	20	3.3	443.3	4	0.4	4	0.4	0.066	8.86

Tabla III.16 .- Producción de aflatoxinas sobre yogur comercial con incubación en envase intacto a 28°C.  
Porcentaje de aflatoxinas detectadas en micelio y yogur

Periodo de Incubación en días	AFLATOXINAS EN MICELIO				AFLATOXINAS EN SUBST.			
	B <sub>1</sub> / B <sub>2</sub> / G <sub>1</sub> / G <sub>2</sub> / M <sub>1</sub>	B / G / M	B <sub>1</sub> : G <sub>1</sub>	B <sub>1</sub> / B <sub>2</sub> / G <sub>1</sub> / G <sub>2</sub> / M <sub>1</sub>	B / G / M			
7	4.44 / 1 / 4.44/ 1 / -	1 / 1 -	1 : 1	6.15/ 1.38/ 3.07/ 1.38/ 1	1.68/ 1/0.22			
8	5 / 1 / 5 / 1 / -	1 / 1 -	1 : 1	22.7/ 3 / 22.7/ 3 / 1	1 / 1 / 0.038			
10	22 / 1.33/ 22 / 4.3 / 1	1 / 1.12/ 0.042	1 : 1	8.75/ 1 / 23.2/ 10 / 1	1 / 3.41/0.102			
15	20 / 3.3 / 20 / 3.3 / 1	1 / 1 / 0.042	1 : 1 <sup>m</sup>	60.6/ 6.06/ 60.6/ 6.06/ 1	1 / 1 / 0.015			



Tabla III.17 .- Producción de aflatoxinas sobre yogur comercial con incubación en envase intacto a 28°C.  
Distribución de aflatoxinas en micelio/substrato

Periodo de incubación en días	AFLATOXINAS EN micelio total / 50g substrato						AFLATOXINAS EN g micelio / g substrato					
	B <sub>1</sub> : B <sub>2</sub>	B <sub>2</sub> : B <sub>1</sub>	G <sub>1</sub> : G <sub>2</sub>	G <sub>2</sub> : G <sub>1</sub>	M <sub>1</sub> : M <sub>2</sub>	T : T	B <sub>1</sub> : B <sub>2</sub>	B <sub>2</sub> : B <sub>1</sub>	G <sub>1</sub> : G <sub>2</sub>	G <sub>2</sub> : G <sub>1</sub>	M <sub>1</sub> : M <sub>2</sub>	T : T
7	1 : 1	1 : 1	2 : 1	1 : 1	-	1 : 15	1512 : 1	1500 : 1	3025 : 1	1500 : 1	-	1744 : 1
8	1 : 50	1 : 33	1 : 50	1 : 33	-	1 : 48	4.27 : 1	6.43 : 1	4.27 : 1	6.43 : 1	-	4.44 : 1
10	1 : 7.57	1 : 14.2	1 : 20.1	1 : 43.9	1 : 19	1 : 16	9.8 : 1	5.36 : 1	3.68 : 1	1.69 : 1	4 : 1	4.48 : 1
15	1 : 10	1 : 6.06	1 : 10	1 : 6.06	1 : 3.3	1 : 9.3	5.12 : 1	8.45 : 1	5.12 : 1	8.45 : 1	15.4 : 1	5.5 : 1

a los 7 días (primer día en que las aflatoxinas fueron detectadas) y más moderado en el resto de los días.

#### III.3.a.3. Incubación en envase dañado a 15°C

Se apreció la aparición de pequeños filamentos fúngicos a los 9 días de incubación, aunque no pudo detectarse la presencia de aflatoxinas.

En la tabla III.18 se indica el grado progresivo de alteración del yogur a lo largo del periodo de incubación. No se apreció esporulación en ninguna de las muestras. El peso de micelio seco sufrió un incremento progresivo a lo largo de la incubación.

En la tabla III.19 se muestran las aflatoxinas detectadas en micelio. En micelio total se aprecia un incremento considerable entre los días 11 y 15, para estabilizarse en este punto. Algo similar ocurre cuando la determinación se hace por g de micelio, aunque con un ligero descenso en los días 17 y 20.

El nivel de producción de aflatoxinas sobre el sustrato viene indicado en la tabla III.20, en que se describe un incremento a lo largo del periodo de incubación en las aflatoxinas detectadas, que alcanzan su punto máximo a los 15 días, para descender posteriormente.

Tabla III.18 .- Producción de aflatoxinas sobre yogur comercial con incubación en envase dañado a 15°C. Grado de alteración del yogur, esporulación y peso de micelio seco

Periodo de incubación en días	Alteración del yogur (a)	Esporulación (b)	Peso micelio seco en mg
10	+ / 0	0	810
11	+ / 0	0	1316
13	+ +	0	2053
15	+ + +	0	3456
17	+ + +	0	3687
20	+ + + +	0	4272

- (a) .- 0:nula; +:pequeños filamentos apenas visibles; ++:micelio cubre toda la superficie con color amarillo del substrato; +++:aparece abundante liquido; ++++: muy abundante crecimiento, muy abundante color amarillo y muy abundante liquido.
- (b) .- Se mide el grado de esporulacion de 0 a ++++ considerando las zonas del micelio que estan esporulando.

Tabla III.19 .- Producción de aflatoxinas sobre yogur comercial con incubación en envase dañado a 15°C.  
Determinación de aflatoxinas en micelio

Periodo de incubación en días	AFLATOXINAS												
	µg / micelio total						µg / g micelio						
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>j</sub>	Total	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>j</sub>	Total	
10	0.013	-	0.013	-	-	0.026	0.016	-	0.016	-	-	0.032	
11	0.013	-	0.013	-	-	0.026	0.0098	-	0.0098	-	-	0.019	
13	200	5	200	5	3.3	413.3	97.41	2.43	97.41	2.43	1.6	201.31	
15	333.2	33.2	500	50	33.2	949.6	96.41	9.6	144.6	14.46	9.6	274.76	
17	333	33.2	500	50	13.3	929.6	90.31	9.03	135.61	13.561	3.6	252.12	
20	400	5	666	5	3	1079.6	93.63	1.17	156.03	1.17	0.7	252.71	

Tabla III.20 .- Producción de aflatoxinas sobre yogur comercial con incubación en envase dañado a 15°C.  
Determinación de aflatoxinas en yogur

Período de incubación en días	AFLATOXINAS											
	µg / 50 g subtrato						µg / g subtrato					
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total
10	0.04	-	0.01	-	-	0.05	0.0008	-	0.0002	-	-	0.001
11	0.05	0.01	0.02	0.01	-	0.116	0.001	0.0002	0.0004	0.0002	-	0.00232
13	200	10	400	20	5	635	4	0.2	8	0.4	0.1	12.7
15	426.24	42.24	512	42.24	4.45	1027.12	8.52	0.84	10.24	0.84	0.088	20.54
17	200	40	444	100	10	794.4	4	0.8	8.89	2	0.2	15.89
20	200	50	400	100	25	775	4	1	8	2	0.5	15.5

El porcentaje de cada una de las aflatoxinas producidas tanto en micelio como en substrato se muestra en la tabla III.21. En el micelio a partir del día 15 se produce un muy ligero predominio de las G sobre las B. En el substrato, si bien en un principio el porcentaje es claramente favorable a la B, a partir del día 13 sucede lo contrario, detectándose aproximadamente el doble de aflatoxina G que de B.

En la tabla III.22 se señala la distribución de aflatoxinas entre micelio y substrato. Cuando la expresión de los resultados se hace en forma de micelio total/50g substrato, si bien se producen ligeras oscilaciones, con excepción del día 11 en que el porcentaje es claramente favorable al substrato, el resto de los días es equiparable. Cuando se expresa en relación gramo a gramo, la distribución es claramente favorable al micelio a todo lo largo de la incubación.

#### III.3.a.4. Incubación en envase intacto a 15°C

Se observó crecimiento fúngico en forma de finos filamentos apenas visibles a los 15 días de incubación, pero hasta el día 17 no pudo ser detectada la producción de aflatoxinas. En este último caso se apreció crecimiento en forma de una fina capa blanquecina que se confundía plenamente con la superficie del yogur.

Tabla III.21 .- Producción de aflatoxinas sobre yogur comercial con incubación en envase dañado a 15°C.  
Porcentaje de cada una de las aflatoxinas producidas en micelio y yogur

Período de incubación en días	AFLATOXINAS EN MICELIO			AFLATOXINAS EN SUBSTRATO		
	$B_1 / B_2 / G_1 / G_2 / M_1$	$B / G / M$	$B_1 : G_1$	$B_1 / B_2 / G_1 / G_2 / M_1$	$B / G / M$	$B_1 : G_1$
10	-	-	1 : 1	-	-	4 : 1
11	-	-	1 : 1	5 / 1 / 2 / 1 / -	-	2.5 : 1
13	60.6/ 1.51/ 60.6/ 1.51/ 1	1 / 1 / 0.016	1 : 1	40 / 2 / 80 / 4 / 1	1 / 2 / 0.023	1 : 2
15	10 / 1 / 15 / 1.5 / 1	1 / 1.5/ 0.09	1 : 1.5	96.8/ 9.6 /116.3/ 9.6 / 1	1 / 1.18/0.009	1 : 1.2
17	25 / 2.5 / 37.5/ 3.75/ 1	1 / 1.5/ 0.036	1 : 1.5	20 / 4 / 44.4/ 10 / 1	1 / 2.26/0.041	1 : 2.22
20	133/ 1.66/ 222 / 1.66/ 1	1 /1.65/ 0.007	1 : 1.66	8 / 2 / 16 / 4 / 1	1 / 2 / 0.1	1 : 2

Tabla III.22 .- Producción de aflatoxinas sobre yogur comercial con incubación en envase sellado a 15°C.  
Distribución de aflatoxinas en micelio/substrato

Período de incubación en días	AFLATOXINAS EN micelio total / 50 g substrato						AFLATOXINAS EN g micelio / g substrato					
	B <sub>1</sub> : B <sub>2</sub>	B <sub>2</sub> : B <sub>1</sub>	G <sub>1</sub> : G <sub>2</sub>	G <sub>2</sub> : G <sub>1</sub>	M <sub>1</sub> : M <sub>2</sub>	T : T	B <sub>1</sub> : B <sub>2</sub>	B <sub>2</sub> : B <sub>1</sub>	G <sub>1</sub> : G <sub>2</sub>	G <sub>2</sub> : G <sub>1</sub>	M <sub>1</sub> : M <sub>2</sub>	T : T
10	1 : 3	-	1.3 : 1	-	-	1 : 1.92	20 : 1	-	80 : 1	-	-	32 : 1
11	1 : 3.84	-	1 : 1.53	-	-	1 : 4.46	9.8 : 1	-	24.5 : 1	-	-	8.18 : 1
13	1 : 1	1 : 2	1 : 2	1 : 4	1 : 1.51	1 : 1.53	24.3 : 1	12.1 : 1	12.1 : 1	6.07 : 1	16 : 1	15.8 : 1
15	1 : 1.27	1 : 1.27	1 : 1.02	1.18 : 1	7.54 : 1	1 : 1.08	11.3 : 1	11.4 : 1	14.1 : 1	17.2 : 1	109 : 1	13.3 : 1
17	1.66 : 1	1 : 1.2	1.12 : 1	1 : 2	1.33 : 1	1.17 : 1	22.5 : 1	11.2 : 1	15.2 : 1	6.78 : 1	18 : 1	15.8 : 1
20	2 : 1	1 : 10	1.66 : 1	1 : 20	1 : 8.33	1.39 : 1	23.4 : 1	1.17 : 1	19.5 : 1	1 : 1.7	1.4 : 1	16.3 : 1



En la tabla III.23 se señala la prácticamente nula alteración del yogur tras 20 días de incubación. No pudo ser detectada esporulación. El peso de micelio seco llega a 470 mg tras 20 días de incubación.

Como corresponde a este bajo nivel de crecimiento, las aflatoxinas detectadas fueron mínimas, tanto en micelio como en sustrato, resultados que se pueden apreciar en las tablas III.23 y III.24. En el micelio únicamente pudieron ser detectadas las aflatoxina B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub>, mientras que en el sustrato se llegaron a determinar las 5 aflatoxinas principales, aunque como hemos indicado, en niveles mínimos.

La proporción de aflatoxinas aparecidas en micelio se muestra favorable a B<sub>1</sub> con respecto a G<sub>1</sub>, mientras que en el sustrato son equiparables ambas, como podemos apreciar en la tabla III.25. En esta misma tabla se muestra la distribución de aflatoxinas micelio/sustrato, que resulta ser favorable al sustrato cuando se establece la comparación en forma de micelio total/50g sustrato, y por contra, claramente favorable al micelio cuando la medición se hace por gramo.

#### III.3.a.5. Incubación en envase dañado a 10°C

Se dejó incubar durante 25 días, no apreciándose ningún signo de crecimiento fúngico, ni por supuesto, de producción de aflatoxinas.

Tabla III.23 .- Producción de aflatoxinas sobre yogur comercial con incubación en envase intacto a 15°C.  
Grado de alteración del yogur, esporulación , peso de micelio seco y determinación de aflatoxinas en micelio

Periodo de incubación en días	Alteración del yogur (a)	Esporulación (b)	Peso micelio seco en mg	AFLATOXINAS			
				µg / micelio total		µg / g micelio	
				B <sub>j</sub>	G <sub>j</sub>	B <sub>j</sub>	G <sub>j</sub>
17	0	0	45	0.013	0.008	0.021	0.28
20	0 / +	0	470	0.05	0.008	0.058	0.106
							0.17
							0.46
							0.017
							0.123

- (a) .- 0: nula; +: pequeños filamentos apenas visibles; ++: micelio cubre toda la superficie con color amarillo del sustrato; +++: aparece abundante líquido; ++++: muy abundante crecimiento, muy abundante color amarillo y muy abundante líquido.
- (b) .- Se mide el grado de esporulación de 0 a ++++ considerando las zonas del micelio que están esporulando.

Tabla III.24 .- Producción de aflatoxinas sobre yogur comercial con incubación en envase intacto a 15°C.  
Determinación de aflatoxinas en yogur

Período de incubación en días	AFLATOXINAS										
	µg / 50 g sustrato						µg / g sustrato				
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	Total
17	0.05	0.006	0.05	0.008	-	0.116	0.001	0.00016	0.001	0.00016	0.0023
20	0.2	0.04	0.2	0.04	0.04	0.52	0.004	0.0008	0.004	0.0008	0.0104

Tabla III.25 .- Producción de aflatoxinas sobre yogur comercial con incubación en envase intacto a 15°C.  
Porcentaje de aflatoxinas detectadas en micelio y yogur, y distribución de aflatoxinas en micelio/substrato

Período de incubación en días	AFLATOXINAS en micelio	AFLATOXINAS EN SUBSTRATO				AFLATOXINAS EN micelio total/50g substr.			AFLATOXINAS EN g micelio / g subestrato		
	B <sub>1</sub> : G <sub>1</sub>	B <sub>1</sub> / B <sub>2</sub> / G <sub>1</sub> / G <sub>2</sub> / M <sub>1</sub>	D / G / M	B <sub>1</sub> : G <sub>1</sub>	B <sub>1</sub> : B <sub>1</sub>	G <sub>1</sub> : G <sub>1</sub>	T : T	B <sub>1</sub> : B <sub>1</sub>	G <sub>1</sub> : G <sub>1</sub>	T : T	
17	1.62 : 1	6.2 / 1 / 6.2 / 1 / -	-	1 : 1	1 : 3.84	1 : 6.25	1:5.52	280: 1	170: 1	200: 1	
20	6.25 : 1	5 / 1 / 5 / 1 / 1	1 / 1 / 0.16	1 : 1	1 : 4	1 : 25	1:8.96	26.5: 1	4.25: 1	11.8: 1	

### III.3.b. Producción de aflatoxinas sobre yogur elaborado por nosotros

#### III.3.b.1. Proceso de elaboración destapado e incubación en envase dañado a 28°C

A las 24h de incubación se aprecian muy ligeros filamentos fúngicos, sin que sean detectadas aflatoxinas. A las 36h los filamentos son más abundantes, no llegan a tomar aspecto compacto, y sólo se detectaron cantidades traza de aflatoxina B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub>. A las 48h, como se puede apreciar en la tabla III.26, el crecimiento micelial fue compacto, formando una tela blanquecina sobre la que se aprecian filamentos de micelio. La esporulación dió comienzo a los 5 días. El peso de micelio seco presenta un incremento progresivo con el tiempo de incubación, con excepción del día 8 en que se describe una disminución del mismo.

En la tabla III.27 se indican los valores de aflatoxinas detectados en el micelio. En el micelio total se va produciendo un incremento progresivo de la cantidad total de aflatoxinas, hasta el día 8 en que disminuye claramente, para volver a incrementarse de nuevo. Cuando la determinación se hace por gramo de micelio, la evolución de las aflatoxinas a

Tabla III.26 .- Producción de aflatoxinas sobre yogur elaborado por nosotros con proceso de elaboración destapado e incubación en envase dañado a 28°C. Grado de alteración del yogur, esporulación y peso de micelio seco

Periodo de incubación en días	Alteración del yogur (a)	Esporulación (b)	Peso micelio seco en mg
2	++	0	349
3	+++	0	1029
4	+++	0	1179
5	+++	0 / +	1867
6	++++	++	2785
7	++++	++	3196
8	++++	++	2819
9	++++	++	3350
10	++++	+++	4261

(a) .- 0:nula; +:pequeños filamentos apenas visibles; ++:micelio cubre toda la superficie con color amarillo del sustrato; +++:aparece abundante líquido; ++++: muy abundante crecimiento, muy abundante color amarillo y muy abundante líquido.

(b) .- Se mide el grado de esporulación de 0 a ++++ considerando las zonas del micelio que están esporulando.

Table III.27 .- Producción de aflatoxinas sobre yogur elaborado por nosotros con proceso de elaboración destapado e incubación en envase dañado a 28°C. Determinación de aflatoxinas en micelio

Periodo de incubación en días	AFLATOXINAS												
	$\mu\text{g} / \text{micelio total}$						$\mu\text{g} / \text{g micelio}$						
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total	
2	20	0.17	20	0.17	0.17	40.51	57.3	0.487	57.3	0.487	0.487	116.07	
3	133	4.4	133	4.4	1	276.4	129.5	4.27	129.5	4.27	0.971	268.6	
4	133	10	133	10	6.6	293.2	113.06	8.48	113.06	8.48	5.59	248.68	
5	400	13.3	400	13.3	11.65	836.25	214.24	7.12	214.24	7.12	6.23	448.98	
6	500	6.6	500	6.6	6.6	1019.8	179.53	2.369	179.53	2.369	2.369	366.17	
7	1000	25	1000	25	16.6	2066.6	312.89	7.82	312.89	7.82	5.19	646.62	
8	666	50	666	50	20	1453.2	236.46	17.73	236.46	17.73	7.09	515.5	
9	733	20.06	733	20.06	14.95	1521.67	218.89	5.98	218.89	5.98	4.46	454.22	
10	1333	20	1333	20	20	2726	312.83	4.69	312.83	4.69	4.69	639.75	

lo largo del periodo de incubación lleva un curso más oscilante, con disminución en sus valores en los días 4, 6, 8 y 9.

Algo parecido a lo que sucede en el micelio se produce en el sustrato, como puede apreciarse en la tabla III.28. El nivel de aflatoxinas totales se va incrementando hasta los días 8 y 9, en que presenta una disminución.

Como se muestra en la tabla III.29, en el micelio la aflatoxina  $M_1$  es siempre la que se produce en un menor nivel. La proporción de  $B_1:G$  se mantiene en 1:1 a lo largo de los 10 días de incubación. A este último respecto, en el sustrato sucede algo parecido, por cuanto las inclinaciones a favor de la  $G$  son muy ligeras; es de señalar que en los días 9 y 10 se produce mayor cantidad de aflatoxina  $M_1$  que de  $B_2$  y  $G_2$ .

En la tabla III.30 se muestra la distribución de aflatoxinas en micelio/sustrato. Cuando se mide en forma de micelio total/50g sustrato, a partir del 4º día la distribución es equiparable, con muy ligeras oscilaciones en uno u otro sentido dependiendo de la aflatoxinas de que se trate. Cuando la expresión de los resultados se hace en forma de g micelio/g sustrato, el valor se muestra claramente inclinado hacia el micelio, para todas las aflatoxinas y en todos los días de incubación.



Tabla III. 28 .- Producción de aflatoxinas sobre yogur elaborado por nosotros con proceso de elaboración destapado e incubación en envase deñado a 28°C. Determinación de aflatoxinas en yogur

Período de incubación en días	AFLATOXINAS											
	µg / 50 g sustrato						µg / g sustrato					
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total
2	8	0.2	10	0.2	0.2	18.6	0.16	0.004	0.2	0.004	0.004	0.372
3	66.6	4.4	66.6	4.4	2.2	144.2	1.33	0.088	1.33	0.088	0.044	2.884
4	133.3	40	133.3	40	40	386.6	2.66	0.8	2.66	0.8	0.8	7.73
5	472	31.1	650	31.1	27.75	1211.95	9.44	0.622	13	0.622	0.555	24.23
6	583	28.85	700	28.85	28.85	1369.55	11.66	0.577	14	0.577	0.577	27.391
7	800	57.14	800	57.14	44.4	1758.68	16	1.14	16	1.14	0.888	35.17
8	666	40	750	40	25	1521.6	13.3	0.8	15	0.8	0.5	30.43
9	619	40.5	733	40.5	44.4	1477.71	12.38	0.81	14.66	0.81	0.888	29.55
10	1333	44.4	1333	44.4	57.14	2811.94	26.66	0.888	26.66	0.888	1.14	56.238

Tabla III.29 .- Producción de aflatoxinas sobre yogur elaborado por nosotros con proceso de elaboración  
destapado e incubación en envase dañado a 28°C. Porcentaje de aflatoxinas detectadas en  
micelio y yogur

Período de incubación en días	AFLATOXINAS EN MICELIO			AFLATOXINAS EN SUBSTRATO		
	B <sub>1</sub> / B <sub>2</sub> / G <sub>1</sub> / G <sub>2</sub> / M <sub>1</sub>	B / G / M	B <sub>1</sub> : G <sub>1</sub>	B <sub>1</sub> / B <sub>2</sub> / G <sub>1</sub> / G <sub>2</sub> / M <sub>1</sub>	B / G / M	B <sub>1</sub> : G <sub>1</sub>
2	117 / 1 / 117 / 1 / 1	1 / 1 / 0.0084	1 : 1	40 / 1 / 50 / 1 / 1	1 / 1.24/0.024	1 : 1.25
3	133 / 4.4 / 133 / 4.4 / 1	1 / 1 / 0.0072	1 : 1	30.2/ 2 / 30.2/ 2 / 1	1 / 1 / 0.03	1 : 1
4	20.1 / 1.51/ 20.1/ 1.51/ 1	1 / 1 / 0.046	1 : 1	3.33/ 1 / 3.33/ 1 / 1	1 / 1 / 0.23	1 : 1
5	34.3 / 1.14/ 34.3/ 1.14/ 1	1 / 1 / 0.028	1 : 1	17 / 1.12/ 23.4/ 1.12/ 1	1 / 1.35/0.055	1 : 1.37
6	75.7 / 1 / 75.7/ 1 / 1	1 / 1 / 0.013	1 : 1	20.2/ 1 / 24.2/ 1 / 1	1 / 1.19/0.047	1 : 1.2
7	60.2 / 1.5 / 60.2/ 1.5 / 1	1 / 1 / 0.016	1 : 1	18 / 1.28/ 18 / 1.28/ 1	1 / 1 / 0.051	1 : 1
8	33.3 / 2.5 / 33.3/ 2.5 / 1	1 / 1 / 0.027	1 : 1	26.6/ 1.6 / 30 / 1.6 / 1	1 / 1.11/0.035	1 : 1.125
9	49.05/ 1.34/49.05/ 1.34/ 1	1 / 1 / 0.019	1 : 1	15.2/ 1 / 18.1/ 1 / 1.096	1 / 1.17/0.067	1 : 1.18
10	66.65/ 1 / 66.65/ 1 / 1	1 / 1 / 0.014	1 : 1	30 / 1 / 30 / 1 / 1.28	1 / 1 / 0.041	1 : 1

Tabla III.30 .-- Producción de aflatoxinas sobre yogur elaborado por nosotros con proceso de elaboración destapado e incubación en envase dañado a 28°C. Distribución de aflatoxinas en micelio/substrato

Periodo de incubación en días	AFLATOXINAS EN micelio total / 50g substrato						AFLATOXINAS EN g micelio / g substrato					
	B <sub>1</sub> : B <sub>2</sub>	B <sub>2</sub> : B <sub>1</sub>	G <sub>1</sub> : G <sub>2</sub>	G <sub>2</sub> : G <sub>1</sub>	M <sub>1</sub> : M <sub>2</sub>	T : T	B <sub>1</sub> : B <sub>2</sub>	B <sub>2</sub> : B <sub>1</sub>	G <sub>1</sub> : G <sub>2</sub>	G <sub>2</sub> : G <sub>1</sub>	M <sub>1</sub> : M <sub>2</sub>	T : T
2	2.5 : 1	1 : 1.17	2 : 1	1 : 1.17	1 : 1.17	2.17 : 1	358 : 1	121 : 1	286 : 1	121 : 1	121 : 1	312 : 1
3	2 : 1	1 : 1	2 : 1	1 : 1	1 : 2.2	1.91 : 1	97.3 : 1	48.5 : 1	97.3 : 1	48.5 : 1	22 : 1	93.1 : 1
4	1 : 1	1 : 4	1 : 1	1 : 4	1 : 6.06	1 : 1.31	42.5 : 1	10.6 : 1	42.5 : 1	10.6 : 1	6.98 : 1	32.1 : 1
5	1 : 1.18	1 : 2.33	1 : 1.6	1 : 2.33	1 : 2.38	1 : 1.44	22.6 : 1	11.4 : 1	16.4 : 1	11.4 : 1	11.2 : 1	18.5 : 1
6	1 : 1.16	1 : 4.37	1 : 1.4	1 : 4.37	1 : 4.37	1 : 1.34	15.3 : 1	4.1 : 1	12.8 : 1	4.1 : 1	4.1 : 1	13.3 : 1
7	1.25 : 1	1 : 2.28	1.25 : 1	1 : 2.28	1 : 2.67	1.17 : 1	19.5 : 1	6.85 : 1	19.5 : 1	6.85 : 1	5.84 : 1	18.38 : 1
8	1 : 1	1.25 : 1	1 : 1.12	1.25 : 1	1 : 1.25	1 : 1.04	17.7 : 1	22.1 : 1	15.7 : 1	22.1 : 1	14.1 : 1	16.9 : 1
9	1.18 : 1	1 : 2.01	1 : 1	1 : 2.01	1 : 2.96	1.02 : 1	17.6 : 1	7.38 : 1	14.9 : 1	17.6 : 1	5.02 : 1	15.3 : 1
10	1 : 1	1 : 2.22	1 : 1	1 : 2.22	1 : 2.85	1 : 1.03	11.7 : 1	5.28 : 1	11.7 : 1	5.28 : 1	4.11 : 1	11.3 : 1

III.3.b.2. Proceso de elaboración destapado e incubación en envase dañado a 15°C

A los 8 días se apreciaron pequeños filamentos fúngicos, indicadores de crecimiento, pero hasta el día 10 no pudieron ser detectadas aflatoxinas. Como se señala en la tabla III.31, en este día la alteración del yogur fue evidente, con micelio cubriendo toda la superficie del yogur, y provocando una pigmentación amarillenta de su superficie. La esporulación no apareció hasta el día 15 de incubación. El peso de micelio seco presentó un incremento progresivo a lo largo del periodo de incubación.

En la tabla III.32 se muestra la detección de aflatoxinas en micelio, que alcanza su máximo en el día 15, para mantenerse estable hasta que finalizó la incubación en el día 20. Toda vez que el valor del peso de micelio seco se va incrementando, cuando la determinación de aflatoxinas se hace por g micelio, alcanza su valor máximo en el día 15, para disminuir progresivamente hasta el día 20.

En cambio, en la producción de aflatoxinas en el sustrato, como se puede apreciar en la tabla III.33, el incremento es progresivo a lo largo de los 20 días de incubación, si bien al final de la misma los valores son bastante parejos, indicando una estabilización de dicha producción.

La proporción de aflatoxinas producidas se indica en la tabla

Tabla III.31 .- Producción de aflatoxinas sobre yogur elaborado por nosotros con proceso de elaboración destapado e incubación en envase dañado a 15°C. Grado de alteración del yogur, esporulación y peso de micelio seco

Periodo de incubación en días	Alteración del yogur (a)	Esporulación (b)	Peso micelio seco en mg
10	+	0	577
12	+	0	1155
15	+++	+	2242
18	++++	++	3273
20	++++	+++	4193

- (a) .- 0:nula; +:pequeños filamentos apenas visibles; ++:micelio cubre toda la superficie con color amarillo del substrato; +++:aparece abundante liquido; ++++: muy abundante crecimiento, muy abundante color amarillo y muy abundante liquido.
- (b) .- Se mide el grado de esporulación de 0 a ++++ considerando las zonas del micelio que estan esporulando.

Tabla III.32 .- Producción de aflatoxinas sobre yogur elaborado por nosotros con proceso de elaboración destapado e incubación en envase dañado a 15°C. Determinación de aflatoxinas en micelio

Periodo de incubación en días	AFLATOXINAS											
	µg / micelio total						µg / g micelio					
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total
10	10	4	20	4.4	1	39.4	17.33	6.93	34.66	7.62	1.73	68.28
12	100	10	200	20	2	332	86.58	8.65	173.16	17.316	0.173	287.44
15	400	20	444	33.3	10	907.7	178.41	8.92	198.21	14.85	4.46	404.86
18	400	20	444	33.3	10	907.7	122.21	6.11	135.77	10.17	3.05	277.32
20	400	20	444	33.3	10	907.7	95.39	4.76	105.98	7.94	2.38	216.47

Tabla III.33 .- Producción de aflatoxinas sobre yogur elaborado por nosotros con proceso de elaboración destapado e incubación en envase dañado a 15°C. Determinación de aflatoxinas en sustrato

Periodo de incubación en días	AFLATOXINAS												
	µg / 50 g sustrato						µg / g sustrato						
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total	
10	40	2	44.4	4	1	91.4	0.8	0.04	0.888	0.08	0.02	1.828	
12	50	4	66.6	6.6	2.5	129.7	1	0.08	1.33	0.13	0.05	2.59	
15	100	10	400	20	6.6	536.6	2	0.2	8	0.4	0.13	10.73	
18	200	20	400	40	5	665	4	0.4	8	0.8	0.1	13.3	
20	200	20	400	40	10	670	4	0.4	8	0.8	0.2	13.4	

III.34. En las mediciones efectuadas al comienzo del crecimiento, en los días 10 y 12 de incubación, se detecta el doble de aflatoxina  $G_1$  que de  $B_1$ , para después estabilizarse y adquirir unos valores más similares. En el substrato sucede al contrario: en los días 10 y 12 apenas hay diferencia entre  $B_1$  y  $G_1$ , mientras que posteriormente el valor se muestra claramente inclinado hacia  $G_1$ . Tanto en micelio como en substrato, la aflatoxina  $M_1$  es siempre la que se produce en un menor nivel.

Como se muestra en la tabla III.35, la proporción de aflatoxinas en micelio total/50g substrato aparece sorprendentemente inclinada en un primer momento hacia el substrato, para a partir del día 12 decantarse hacia el micelio. Cuando la medición se hace en g micelio/g substrato, el valor se muestra claramente favorable hacia el micelio.

III.3.b.3. Proceso de elaboración destapado e incubación en envase dañado a 10°C

Tras 25 días no se apreció crecimiento de ningún tipo por parte de la cepa aflatoxicogénica.



Tabla III.34 .- Producción de aflatoxinas sobre yogur elaborado por nosotros con proceso de elaboración destapado e incubación en envase dañado a 15°C. Porcentaje de aflatoxinas detectadas en micelio y yogur

Periodo de incubación en días	AFLATOXINAS EN MICELIO				AFLATOXINAS EN SUBSTRATO			
	B <sub>1</sub> / B <sub>2</sub> / G <sub>1</sub> / G <sub>2</sub> / M <sub>1</sub>	B / G / M	B <sub>1</sub> : G <sub>1</sub>		B <sub>1</sub> / B <sub>2</sub> / G <sub>1</sub> / G <sub>2</sub> / M <sub>1</sub>	B / G / M	B <sub>1</sub> : G <sub>1</sub>	
10	10 / 4 / 20 / 4.4 / 1	1 / 1.74 / 0.071	1 : 2		40 / 2 / 44.4 / 4 / 1	1 / 1.15 / 0.023	1 : 1.11	
12	50 / 5 / 100 / 10 / 1	1 / 2 / 0.018	1 : 2		20 / 1.6 / 26.6 / 2.64 / 1	1 / 1.35 / 0.046	1 : 1.33	
15	40 / 2 / 44.4 / 3.33 / 1	1 / 1.13 / 0.023	1 : 1.11		15.1 / 1.51 / 60.6 / 3.03 / 1	1 / 3.81 / 0.06	1 : 4	
18	40 / 2 / 44.4 / 3.33 / 1	1 / 1.13 / 0.023	1 : 1.11		40 / 4 / 80 / 8 / 1	1 / 2 / 0.022	1 : 2	
20	40 / 2 / 44.4 / 3.33 / 1	1 / 1.13 / 0.023	1 : 1.11		20 / 2 / 40 / 4 / 1	1 / 2 / 0.045	1 : 2	

Tabla III.35 .- Producción de aflatoxinas en yogur elaborado por nosotros con proceso de elaboración destapado e incubación en envase dañado a 15°C. Distribución de aflatoxinas en micelio/substrato.

Periodo de incubación en días	AFLATOXINAS EN micelio total / 50 g substrato					AFLATOXINAS EN g micelio / g substrato				
	B <sub>1</sub> : B <sub>2</sub>		G <sub>1</sub> : G <sub>2</sub>		T : T	B <sub>1</sub> : B <sub>2</sub>		G <sub>1</sub> : G <sub>2</sub>		T : T
	B <sub>1</sub> : B <sub>2</sub>	B <sub>1</sub> : B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub> : G <sub>2</sub>	G <sub>1</sub> : G <sub>2</sub>		B <sub>1</sub> : B <sub>2</sub>	B <sub>1</sub> : B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub> : G <sub>2</sub>	G <sub>1</sub> : G <sub>2</sub>	
10	1 : 4	2 : 1	1 : 2.24	1.1 : 1	1 : 2.31	173 : 1	21.6 : 1	39 : 1	95.2 : 1	86.5 : 1
12	2 : 1	2.5 : 1	3 : 1	3.03 : 1	2.5 : 1	108 : 1	86.5 : 1	130 : 1	133 : 1	3.46 : 1
15	4 : 1	2 : 1	1.1 : 1	1.66 : 1	1.69 : 1	44.6 : 1	89.2 : 1	24.7 : 1	37.1 : 1	34.3 : 1
18	2 : 1	1 : 1	1.1 : 1	1 : 1.2	1.36 : 1	15.2 : 1	30.5 : 1	16.9 : 1	12.7 : 1	30.5 : 1
20	2 : 1	1 : 1	1.1 : 1	1 : 1.2	1.35 : 1	11.9 : 1	23.8 : 1	13.2 : 1	9.92 : 1	11.9 : 1

III.3.b.4. Proceso de elaboración destapado e incubación en envase dañado 24h a 28°C y después a 10°C

Tras 25 días a 10 °C no se apreció crecimiento, ni por supuesto producción de aflatoxinas.

III.3.b.5. Proceso de elaboración destapado e incubación en envase intacto a 28°C

Como se muestra en la tabla III.36, no se apreciaron signos de crecimiento hasta el día 15, ligero y sin llegar a ocupar toda la superficie del yogur. No se observó esporulación tras 20 días de incubación; al cabo de este tiempo el peso de micelio seco alcanzó únicamente 296 mg, detectándose en él únicamente aflatoxinas B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub>, y en valores muy bajos (0.2 µg como máximo). Es de destacar que a los 15 días se detectó una cantidad de aflatoxina superior a la determinada a los 20 días.

En el sustrato en cambio, como puede apreciarse en la tabla III.37, se produjeron las 5 aflatoxinas principales, en un nivel que a los 20 días llegó a ser de 7.8 µg, muy superior al encontrado a los 15 días (0.505 µg).

Como se indica en la tabla III.38, la proporción de aflatoxinas B<sub>1</sub>:G<sub>1</sub> en micelio fue 1:1. Este mismo valor alcanzó en el sustrato a los 15 días, pero a los 20 se detectó el doble de B<sub>1</sub> que de G<sub>1</sub>.

La distribución de aflatoxinas en micelio total/50g sustrato se muestra claramente inclinada hacia el sustrato, sobre

Tabla III.36 .- Producción de aflatoxinas sobre yogur elaborado por nosotros con proceso de elaboración destapado e incubación en envase intacto a 28°C. Grado de alteración del yogur, esporulación, peso de micelio seco y aflatoxinas determinadas en micelio.

Período de incubación en días	Alteración del yogur (a)	Esporulación (b)	Peso micelio seco en mg	AFLATOXINAS				
				µg / micelio total		µg / g micelio		
				B <sub>1</sub>	G <sub>1</sub>	Total	B <sub>1</sub>	G <sub>1</sub> Total
15	+ / 0	0	126	0.1	0.1	0.2	0.79	0.79 1.58
20	+	0	296	0.05	0.04	0.09	0.168	0.135 0.305

(a) .- 0: nula; +: pequeños filamentos apenas visibles; ++: micelio cubre toda la superficie con color amarillo del substrato; +++: aparece abundante líquido; ++++: muy abundante crecimiento, muy abundante color amarillo y muy abundante líquido.

(b) .- Se mide el grado de esporulación de 0 a +++ considerando las zonas del micelio que están esporulando.

Tabla III.37 .- Producción de aflatoxinas sobre yogur elaborado por nosotros con proceso de elaboración destapado e incubación en envase Intacto a 28°C. Determinación de aflatoxinas en yogur.

A F L A T O X I N A S												
Periodo de incubación en días	µg / 50 g sustrato						µg / g sustrato					
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total
15	0.2	0.04	0.2	0.04	0.025	0.505	0.004	0.0008	0.004	0.0008	0.0005	0.01
20	4	0.6	2	1	0.2	7.8	0.08	0.012	0.04	0.02	0.004	0.156

Tabla III.38 .- Producción de aflatoxinas sobre yogur elaborado por nosotros con proceso de elaboración destapado e incubación en envase intacto a 28°C. Porcentaje de aflatoxinas detectadas en micelio y yogur, y distribución de aflatoxinas en micelio/substrato

Periodo de Incubación en días	AFLATOXINAS en micelio $B_1 : G_1$	AFLATOXINAS EN SUBSTRATO				AFLATOXINAS EN micelio total/50g substr.			AFLATOXINAS EN g micelio / g subestrato		
		$B_1 / B_2 / G_1 / G_2 / M_1$	$B / G / M$	$B_1 : G_1$	$B_1 : B_1$	$G_1 : G_1$	$T : T$	$B_1 : B_1$	$G_1 : G_1$	$T : T$	
15	1 : 1	8 / 1.6 / 8 / 1.6 / 1	1 / 1 / 0.104	1 : 1	1 : 2	1 : 2	1 : 2.52	197: 1	197: 1	158: 1	
20	1.25: 1	20 / 3 / 10 / 5 / 1	1.53/ 1 / 0.06	2 : 1	1 : 80	1 : 50	1 : 86.6	2.1: 1	3.3: 1	1.92: 1	

todo a los 20 días de incubación. Cuando los cálculos se efectúan en forma de g micelio/g substrato, a los 15 días se muestra claramente favorable al micelio, mientras que a los 20 la diferencia es apenas significativa a favor del micelio.

III.3.b.6. Proceso de elaboración destapado e incubación en envase intacto a 15°C

En la tabla III.39 se pueden apreciar los resultados obtenidos dentro de estas experiencias.

El crecimiento fúngico se produjo en forma de membrana blanquecina, no diferenciable de la superficie del yogur a simple vista, que comenzó a aparecer a los 15 días, aunque las aflatoxinas no llegaron a ser detectadas hasta el día 18, en que si bien dicha membrana alcanzó un tamaño considerable, nada la hacía diferenciable de la superficie del yogur, por lo que en la tabla indicamos que el nivel de alteración del mismo resultó ser nulo.

Tanto en micelio como en substrato únicamente pudieron ser detectadas las aflatoxinas B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub>, en muy bajos niveles, y en el caso del substrato, únicamente a los 20 días de incubación.

La proporción de ambas aflatoxinas tanto en micelio como en substrato es 1:1. La relación micelio total/50g substrato también se muestra equiparable, mientras que cuando se determina gramo a gramo el valor resultó estar claramente inclinado hacia el micelio.

Tabla III.39 .- Producción de aflatoxinas en yogur elaborado por nosotros.  
Proceso de elaboración destapado e incubación en envase  
intacto a 15°C

Periodo de incubación en días			18	20
Alteracion (a) substrato			0	0 / +
Esporulacion (b)			0	0
Peso micelio seco en mg			556	792
AFLATOXINAS EN MICELIO	B <sub>1</sub>	µg/total	0.04	0.05
		µg/g	0.071	0.063
	G <sub>1</sub>	µg / total	0.04	0.05
		µg / g	0.071	0.063
	B <sub>1</sub> : G <sub>1</sub>		1 : 1	1 : 1
AFLATOXINAS EN SUBSTRATO	B <sub>1</sub>	µg / 50g	-	0.044
		µg / g	-	0.00088
	G <sub>1</sub>	µg / 50g	-	0.044
		µg / g	-	0.00088
	B <sub>1</sub> : G <sub>1</sub>		-	1 : 1
AFLATOXINAS micelio / substrato	T / 50g	B <sub>1</sub> : B <sub>1</sub>	-	1.13: 1
		G <sub>1</sub> : G <sub>1</sub>	-	1.13: 1
	g / g	B <sub>1</sub> : B <sub>1</sub>	-	71.5: 1
		G <sub>1</sub> : G <sub>1</sub>	-	71.5: 1



III.3.b.7. Proceso de elaboración tapado e incubación en envase intacto a 28°C

Tras 25 días de incubación se apreciaron pequeños filamentos como muestra del crecimiento fúngico, sin que se llegaran a detectar aflatoxinas ni siquiera en cantidades traza.

III.3.b.8. Proceso de elaboración tapado e incubación en envase intacto a 15°C

No se apreció tras 25 días de incubación ningún signo de crecimiento.

III.3.b.9. Inoculación posterior a la elaboración e incubación a 28°C

El objeto de estos estudios era comparar el yogur comercial por una parte y el elaborado por nosotros por otra como posibles substratos para la producción de aflatoxinas. Unicamente se efectuó toma de muestras en los días 5, 7 y 10, siendo evidentes las alteraciones del yogur como se señala en la tabla III.40. El peso de micelio seco alcanzó su valor máximo en el día 10, que fue establecido en 5070 mg.

Tabla III.40 .- Producción de aflatoxinas sobre yogur elaborado por nosotros con inoculación posterior a la elaboración e incubación a 28°C. Grado de alteración del yogur, esporulación y peso de micelio seco.

Periodo de incubación en días	Alteración del yogur (a)	Esporulación (b)	Peso micelio seco en mg
5	+ + +	+	1701
7	+ + +	+	3086
10	+ + + +	+ + +	5070

(a) .- 0:nula; +:pequeños filamentos apenas visibles; ++:micelio cubre toda la superficie con color amarillo del substrato; +++:aparece abundante liquido; ++++: muy abundante crecimiento, muy abundante color amarillo y muy abundante liquido.

(b) .- Se mide el grado de esporulacion de 0 a ++++ considerando las zonas del micelio que estan esporulando.

En la tabla III.41 se muestran los valores de aflatoxinas detectadas en el micelio, que van en incremento respecto al micelio total, pero que cuando se expresan por gramo de micelio muestran valores descendentes a lo largo de la incubación.

En la tabla III.42 se pueden apreciar los valores de aflatoxinas detectados en sustrato, que se van incrementando a lo largo del periodo de incubación.

La proporción de aflatoxinas B:G detectadas mantiene un nivel 1:1 tanto en micelio como en sustrato. A los 10 días en sustrato se detecta una cantidad ligeramente superior de aflatoxina  $M_1$  que de  $B_2$  y  $G_2$ . Esto puede ser apreciado en la tabla III.43.

Como se muestra en la tabla III.44, la proporción de aflatoxinas en micelio/sustrato cuando se mide en forma de micelio total/50g sustrato muestra valores muy próximos a 1:1 a todo lo largo de la incubación. Cuando la expresión de los resultados se hace por gramo, los valores se muestran inclinados hacia el micelio.

III.3.b.10. Inoculación posterior a la elaboración e incubación a 15°C

Lo mismo que en el caso anterior, esta experiencia se llevó a

Tabla III.41 .- Producción de aflatoxinas sobre yogur elaborado por nosotros con inoculación posterior a la elaboración e incubación a 28°C. Determinación de aflatoxinas en micelio

Periodo de incubación en días	AFLATOXINAS											
	µg / micelio total						µg / g micelio					
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total
5	400	20	400	20	10	850	235.15	11.75	235.15	11.75	5.87	499.7
7	666	40	666	40	10	1423.2	216	12.96	216	12.96	3.24	461.17
10	800	36	800	36	20	1693.2	157.79	7.21	157.79	7.21	3.94	333.96

Tabla III.42 .- Producción de aflatoxinas en yogur elaborado por nosotros, con inoculación posterior a la elaboración e incubación a 28°C. Determinación de aflatoxinas en sustrato

Período de Incubación en días	A F L A T O X I N A S											
	µg / 50 g sustrato						µg / g sustrato					
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total
5	400	28.5	400	28.5	3.3	860.3	8	0.57	8	0.57	0.066	17.2
7	571	100	666	100	40	1477	11.42	2	13.32	2	0.8	29.54
10	800	57.14	800	57.14	66.6	1780.88	16	1.14	16	1.14	1.332	35.61

Tabla III.43 .- Producción de aflatoxinas en yogur elaborado por nosotros, con inoculación posterior a la elaboración e incubación a 28°C. Porcentaje de aflatoxinas detectadas en micelio y yogur

Periodo de incubación en días	AFLATOXINAS EN MICELIO				AFLATOXINAS EN SUBSTRATO			
	$B_1 / B_2$	$G_1 / G_2$	$M_1$	$B / G / M$	$B_1 : G_1$	$B_1 / B_2$	$G_1 / G_2$	$M_1$
5	40 / 2	40 / 2	1	1 / 1 / 0.023	1 : 1	121 / 8.63	121 / 8.63	1
7	66.6 / 4	66.6 / 4	1	1 / 1 / 0.014	1 : 1	14.2 / 2.5	16.6 / 2.5	1
10	40 / 1.86	40 / 1.86	1	1 / 1 / 0.023	1 : 1	14 / 1	14 / 1	1

Tabla III.44. - Producción de aflatoxinas sobre yogur elaborado por nosotros con inoculación posterior a la elaboración e incubación a 28°C. Distribución de aflatoxinas en micelio/substrato

Período de incubación en días	AFLATOXINAS EN micelio total / 50 g substrato						AFLATOXINAS EN g micelio / g substrato					
	B <sub>1</sub> : B <sub>2</sub>	B <sub>2</sub> : B <sub>1</sub>	G <sub>1</sub> : G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub> : M <sub>2</sub>	T : T		B <sub>1</sub> : B <sub>2</sub>	B <sub>2</sub> : B <sub>1</sub>	G <sub>1</sub> : G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub> : M <sub>2</sub>	T : T	
5	1 : 1	1 : 1.42	1 : 1	1 : 1.42	3.03 : 1	1 : 1.01	29.3 : 1	20.6 : 1	29.3 : 1	20.6 : 1	88.9 : 1	29 : 1
7	1.16 : 1	1 : 2.5	1 : 1	1 : 2.5	1 : 4	1 : 1.03	18.9 : 1	6.48 : 1	16.2 : 1	6.48 : 1	4.05 : 1	15.6 : 1
10	1 : 1	1 : 1.56	1 : 1	1 : 1.56	1 : 3.33	1 : 1.05	9.86 : 1	6.32 : 1	9.86 : 1	6.32 : 1	2.95 : 1	9.37 : 1

cabo para comparar como substrato el yogur comercial y el yogur elaborado por nosotros. Unicamente se efectuó toma de muestras en los días 10 y 15.

Como se señala en la tabla III.45, a los 15 días de incubación se apreció inicio de la esporulación. En esta tabla se muestra también el grado de alteración del yogur y el peso de micelio seco.

En la tabla III.46 se indican las aflatoxinas detectadas en el micelio, mientras que los valores determinados en el substrato aparecen en la tabla III.47.

La proporción de aflatoxinas producidas se representa en la tabla III.48. En el micelio a los 10 días se encuentran 3 veces más aflatoxina B que G, mientras que a los 15 días el doble de aflatoxina G que B. En el substrato, a los 10 días, la proporción es 1:1, mientras que a los 15 hay el doble de producción de G que de B.

La distribución de aflatoxinas en micelio/substrato se muestra ligeramente inclinada hacia este último cuando la medición se efectúa en micelio total/50g substrato, mientras que cuando se hace gramo a gramo esta claramente inclinada hacia el micelio, como puede apreciarse en la tabla III.49.



Tabla III.45 .- Producción de aflatoxinas sobre yogur elaborado por nosotros con inoculación posterior a la elaboración e incubación a 15°C. Grado de alteración del yogur, esporulación y peso de micelio seco

Periodo de incubación en días	Alteración del yogur (a)	Esporulación (b)	Peso micelio seco en mg
10	+	0	756
15	+++	+	1163

- (a) .- 0:nula; +:pequeños filamentos apenas visibles; ++:micelio cubre toda la superficie con color amarillo del substrato; +++:aparece abundante liquido; ++++: muy abundante crecimiento, muy abundante color amarillo y muy abundante liquido.
- (b) .- Se mide el grado de esporulación de 0 a ++++ considerando las zonas del micelio que estan esporulando.

Tabla III.46 .- Producción de aflatoxinas sobre yogur elaborado por nosotros con inoculación posterior a la elaboración e incubación a 15°C. Determinación de aflatoxinas en micelio.

	AFLATOXINAS												
Periodo de Incubación en días	µg / micelio total						µg / g micelio						
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total	
10	4	1	1.3	0.6	0.2	7.1	5.29	1.32	1.71	0.79	0.26	9.39	
15	100	25	200	25	20	370	85.98	21.49	171.96	21.49	17.19	318.14	

Tabla III.47 .- Producción de aflatoxinas sobre yogur elaborado por nosotros con inoculación posterior a la elaboración e incubación a 15°C. Determinación de aflatoxinas en yogur

Período de incubación en días	A F L A T O X I N A S										
	$\mu\text{g} / 50 \text{ g}$ sustrato					$\mu\text{g} / \text{g}$ sustrato					
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	Total
10	4	0.25	4	0.285	0.2	8.735	0.08	0.005	0.08	0.0057	0.17
15	200	40	400	100	20	760	4	0.8	8	2	15.2

Tabla III.48 .- Producción de aflatoxinas sobre yogur elaborado por nosotros con inoculación posterior a la elaboración e incubación a 15°C. Porcentaje de aflatoxinas detectadas en micelio y yogur

Periodo de Incubación en días	AFLATOXINAS EN MICELIO			AFLATOXINAS EN SUBSTRATO			
	$B_1 / B_2 / G_1 / G_2 / M_1$	$B / G / M$	$B_1 : G_1$	$B_1 / B_2 / G_1 / G_2 / M_1$	$B / G / M$	$B_1 : G_1$	
10	20 / 5 / 6.5 / 3 / 1	2.6/ 1 /0.1	3 : 1	20 / 1.25/ 20 / 1.42/ 1	1 / 1 /0.04	1 : 1	
15	5 / 1.25/ 10 / 1.25/ 1	1 /1.8/0.16	1 : 2	10 / 2 / 20 / 5 / 1	1 / 2 /0.08	1 : 2	

Tabla III.49 .-- Producción de aflatoxinas sobre yogur elaborado por nosotros con inoculación posterior a la elaboración e incubación a 15°C. Distribución de aflatoxinas en micelio/substrato

Período de incubación en días	AFLATOXINAS EN micelio total / 50 g substrato						AFLATOXINAS EN g micelio / g substrato					
	B <sub>1</sub> : B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub> : B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub> : G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub> : G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub> : M <sub>1</sub>	T : T	B <sub>1</sub> : B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub> : B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub> : G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub> : G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub> : M <sub>1</sub>	T : T
10	1 : 1	4 : 1	1 : 3.07	2.1 : 1	1 : 1	1 : 1.23	66.1 : 1	264 : 1	21.3 : 1	139.5 : 1	65 : 1	55.2 : 1
15	1 : 2	1 : 1.6	1 : 2	1 : 4	1 : 1	1 : 2.05	21.4 : 1	26.8 : 1	21.4 : 1	10.7 : 1	42.9 : 1	20.9 : 1

III.3.b.11. Proceso de elaboración destapado e incubación en envase dañado a 28°C, inoculando con la cepa aflatoxicogénica Aspergillus flavus NRRL 3251.

Se pretendía comparar estos resultados con los obtenidos con la cepa A.parasiticus NRRL 2999. La cepa de A.flavus estudiada no tiene capacidad de síntesis de aflatoxina G.

Como se muestra en la tabla III.50, a los 2 días el crecimiento fúngico ya resultó ser evidente, causando pigmentación amarillenta de la superficie del yogur. La esporulación apareció a partir del 5º día. Mientras que el valor del peso de micelio seco muestra un incremento progresivo a lo largo del periodo de incubación, las aflatoxinas detectadas en micelio alcanzan su máximo a los 8 días, para disminuir considerablemente (casi a la mitad) a los 10 días. Cuando la medición se efectúa por g de micelio, el máximo se alcanza a los 5 días, para descender tanto a los 8 como a los 10 días.

Algo similar ocurre en el substrato, como aparece reflejado en la tabla III.51, por cuanto la máxima cantidad de aflatoxinas se detectó a los 5 días, después descendió a los 8 días, y a los 10 volvió a incrementarse, aunque sin alcanzar los niveles hallados al 5º día.

En la tabla III.52 se expresa la proporción de cada una de las aflatoxinas producidas, así como la distribución entre micelio/substrato, que se muestra claramente favorable al

Tabla III.50 .- Producción de aflatoxinas sobre yogur elaborado por nosotros con proceso de elaboración destapado e incubación en envase dañado a 28°C, inoculado con la cepa A.flavus NRRL 3251. Grado de alteración del yogur, esporulación, peso de micelio seco y determinación de aflatoxinas en micelio

Periodo de incubación en días	Alteración del yogur (a)	Esporulación (b)	Peso micelio seco en mg	A F L A T O X I N A S							
				µg / micelio total				µg / g micelio			
				B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total
2	++	0	208	40	1	0.57	41.57	192.3	4.8	2.74	199.85
5	+++	++	733	180	2.57	1.8	184.37	245.56	3.5	2.45	251.52
8	+++	++	2746	230	3.85	3.77	237.62	83.75	1.4	1.37	86.53
10	++++	+++	4052	124	1.86	1.86	127.72	30.6	0.45	0.45	31.52

(a) .- 0:nula; ++:pequeños filamentos apenas visibles; +++:micelio cubre toda la superficie con color amarillo del substrato; ++++:aparece abundante líquido; ++++: muy abundante crecimiento, muy abundante color amarillo y muy abundante líquido.

(b) .- Se mide el grado de esporulación de 0 a ++++ considerando las zonas del micelio que estan esporulando.

Tabla III.51 .- Producción de aflatoxinas sobre yogur elaborado por nosotros con proceso de elaboración destapado e incubación en envase dañado a 28°C, inoculado con la cepa A.flovis MRL 3251. Determinación de aflatoxinas en sustrato

Período de incubación en días	AFLATOXINAS							
	µg / 50 g sustrato				µg / g sustrato			
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total
2	66.6	3.3	2	71.9	1.33	0.066	0.04	1.438
5	440	22	8.8	450.8	8.8	0.44	0.176	9.016
8	310	17.71	12.4	340.11	6.2	0.35	0.24	6.8
10	360	23.94	14.4	398.34	7.2	0.47	0.28	7.96



Tabla III.52 .- Producción de aflatoxinas sobre yogur elaborado por nosotros con proceso de elaboración destapado e incubación en envase dañado a 28°C, inoculado con la cepa A.flavus NRRL 3251. Porcentaje de aflatoxinas detectadas en micelio y yogur, y distribución de aflatoxinas en micelio/substrato

Periodo de incubación en días	Aflatoxinas en micelio		Aflatoxinas en substrato		micelio total / 50 g substrato				g micelio / g substrato			
	$B_1$	$B_2$ / $M_1$	$B_1$ / $B_2$ / $M_1$	$B_1$ : $B_2$ / $M_1$	$B_1$ : $B_2$	$M_1$ : $M_1$	$T$ : $T$	$T$ : $T$	$B_1$ : $B_2$	$B_2$ : $B_2$	$M_1$ : $M_1$	$T$ : $T$
2	70.1	/ 1.75/ 1	33.3/ 1.6 / 1	1 : 1.66	1 : 3.3	1 : 3.5	1 : 1.72	144: 1	72.7: 1	68.5: 1	130.9: 1	
5	100	/ 1.42/ 1	50 / 2.5 / 1	1 : 2.44	1 : 8.56	1 : 4.88	1 : 2.44	27.9: 1	7.95: 1	13.9: 1	27.8: 1	
8	61	/ 1.02/ 1	25 / 1.42/ 1	1 : 1.34	1 : 4.6	1 : 3.28	1 : 1.43	13.5: 1	4 : 1	5.7 : 1	12.7: 1	
10	66.6/	1 / 1	25 / 1.66/ 1	1 : 2.9	1 : 12.8	1 : 7.74	1 : 3.11	4.25: 1	1 : 1.04	1.6 : 1	3.95: 1	

substrato cuando se mide en forma de micelio total/50g substrato, para suceder lo contrario cuando se expresa gramo a gramo.

#### III.C.b.12. Influencia del tamaño del inóculo sobre la producción de aflatoxinas en yogur

En todos los casos el proceso de elaboración se efectuó con el yogur destapado y la incubación en envase dañado a 28°C durante 10 días.

El grado de alteración del yogur fue máximo en todos los tamaños de inóculo investigados, como puede apreciarse en la tabla III.53. La esporulación alcanzó su valor máximo en los inóculos  $4 \times 10^2$  a  $4 \times 10^4$ , algo inferior en el  $4 \times 10^5$ , y menor en los dos inóculos extremos,  $4 \times 10$  y  $4 \times 10^6$ . El peso de micelio seco se fue incrementando con el tamaño del inóculo.

En la tabla III.54 se muestra el nivel de aflatoxinas detectado en el micelio en cada uno de los inóculos. Dicho nivel permaneció estable o se incrementó ligeramente con el aumento del tamaño del inóculo, excepto en el inóculo mayor,  $4 \times 10^6$  esporas, en que el nivel detectado fue muy inferior al de cualquier otro de los tamaños de inóculo investigados. Cuando la expresión de los niveles de aflatoxinas detectados se hace por gramo de micelio, dicha cantidad va disminuyendo

Tabla III.53 .- Influencia del tamaño del inóculo sobre la producción de aflatoxinas en yogur elaborado por nosotros. Grado de alteración del yogur, esporulación y peso de micelio seco

Inóculo en esporas	Alteración del yogur (a)	Esporulación (b)	Peso micelio seco en mg
$4 \times 10$	+++	++	1543
$4 \times 10^2$	++++	++++	3709
$4 \times 10^3$	++++	++++	4029
$4 \times 10^4$	++++	++++	4047
$4 \times 10^5$	++++	+++	4404
$4 \times 10^6$	++++	++	4665

- (a) .- 0:nula; +:pequeños filamentos apenas visibles; ++:micelio cubre toda la superficie con color amarillo del substrato; +++:aparece abundante liquido; ++++: muy abundante crecimiento, muy abundante color amarillo y muy abundante liquido.
- (b) .- Se mide el grado de esporulación de 0 a ++++ considerando las zonas del micelio que estan esporulando.

Tabla III.54 .- Influencia del tamaño del inóculo sobre la producción de aflatoxinas en yogur elaborado por nosotras. Determinación de aflatoxinas en micelio

Inóculo en esporas	A F L A T O X I N A S												
	µg / micelio total						µg / g micelio						
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total	
4 x 10	1000	25	1000	25	20	2070	648	16.2	648	16.2	12.9	1341.5	
4 x 10 <sup>2</sup>	1000	25	1000	25	20	2070	269.6	6.7	269.6	6.7	5.3	558.1	
4 x 10 <sup>3</sup>	1000	50	1000	50	25	2125	248.2	12.4	248.2	12.4	6.2	527.4	
4 x 10 <sup>4</sup>	1000	50	1000	50	25	2125	247	12.3	247	12.3	6.17	525	
4 x 10 <sup>5</sup>	1200	30	1200	30	30	2490	272.4	6.8	272.4	6.8	6.8	565.3	
4 x 10 <sup>6</sup>	650	50	650	50	20	1420	139.3	10.7	139.3	10.7	4.28	304.3	

con el incremento del tamaño del inóculo, con la excepción de  $4 \times 10^5$  en que aumenta ligeramente.

Los niveles de aflatoxinas producidas en el substrato aparecen indicados en la tabla III.55, y muestran un nivel más estable que en el caso de las aflatoxinas en micelio, con ligeras oscilaciones que vienen significadas por un incremento en  $4 \times 10^3$  y disminución en  $4 \times 10^6$ , en este último caso de forma paralela a lo que sucedía en el micelio.

La proporción de aflatoxinas B:G presenta un nivel 1:1 en todos los inóculos investigados, y tanto en micelio como en substrato (Tabla III.56). En algunos de los inóculos el nivel de aflatoxina  $M_1$  en substrato alcanza valores muy altos en relación a las aflatoxinas B y G producidas.

La distribución de aflatoxinas en micelio/substrato, cuando se hace en forma de micelio total/50g substrato se muestra inclinada hacia el micelio para las aflatoxinas  $B_1$  y  $G_1$  en todos los tamaños de inóculo, mientras que se inclinó hacia el substrato en las otras aflatoxinas,  $B_2$ ,  $G_2$  y  $M_1$  (Tabla III.57).

Tabla III.55 .- Influencia del tamaño del inóculo sobre la producción de aflatoxinas en yogur elaborado por nosotros. Determinación de aflatoxinas en sustrato

A F L A T O X I N A S												
Inóculo en esporas	µg / 50g sustrato						µg / g sustrato					
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total
4 x 10	500	80	500	80	65	1225	10	1.6	10	1.6	1.3	24.5
4 x 10 <sup>2</sup>	500	80	500	80	65	1225	10	1.6	10	1.6	1.3	24.5
4 x 10 <sup>3</sup>	650	100	650	100	50	1550	13	2	13	2	1	31
4 x 10 <sup>4</sup>	500	100	500	100	65	1265	10	2	10	2	1.3	25.3
4 x 10 <sup>5</sup>	620	40	620	40	35	1355	12.4	0.8	12.4	0.8	0.7	27.1
4 x 10 <sup>6</sup>	445	65	445	65	50	1070	8.9	1.3	8.9	1.3	1	21.4

Tabla III.56 .- Influencia del tamaño del inóculo sobre la producción de aflatoxinas en yogur elaborado por nosotros. Porcentaje de aflatoxinas detectadas en micelio y yogur

Inoculación en esporas	AFLATOXINAS EN MICELIO			AFLATOXINAS EN SUBSTRATO		
	$B_1 / B_2 / G_1 / G_2 / M_1$	B / G / M	$B_1 : G_1$	$B_1 / B_2 / G_1 / G_2 / M_1$	B / G / M	$B_1 : G_1$
$4 \times 10$	50 / 1.25/ 50 / 1.25/ 1	1 / 1 / 0.019	1 : 1	7.69/ 1.23/ 7.69/ 1.23/ 1	1 / 1 / 0.112	1 : 1
$4 \times 10^2$	50 / 1.25/ 50 / 1.25/ 1	1 / 1 / 0.019	1 : 1	7.69/ 1.23/ 7.69/ 1.23/ 1	1 / 1 / 0.112	1 : 1
$4 \times 10^3$	40 / 2 / 40 / 2 / 1	1 / 1 / 0.023	1 : 1	13 / 2 / 13 / 2 / 1	1 / 1 / 0.066	1 : 1
$4 \times 10^4$	40 / 2 / 40 / 2 / 1	1 / 1 / 0.023	1 : 1	7.69/ 1.53/ 7.69/ 1.53/ 1	1 / 1 / 0.108	1 : 1
$4 \times 10^5$	40 / 1 / 40 / 1 / 1	1 / 1 / 0.024	1 : 1	17.7/ 1.14/ 17.7/ 1.14/ 1	1 / 1 / 0.053	1 : 1
$4 \times 10^6$	32.5/ 2.5 / 32.5/ 2.5 / 1	1 / 1 / 0.028	1 : 1	8.9/ 1.3 / 8.9 / 1.3 / 1	1 / 1 / 0.098	1 : 1

Tabla III.57 .- Influencia del tamaño del inóculo sobre la producción de aflatoxinas en yogur elaborado por nosotros. Distribución de aflatoxinas en micelio/substrato

Inoculación en esporas	AFLATOXINAS EN micelio total / 50g substrato						AFLATOXINAS EN g micelio / g substrato					
	B <sub>1</sub> : B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub> : B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub> : G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub> : G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub> : M <sub>1</sub>	T : T	B <sub>1</sub> : B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub> : B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub> : G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub> : G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub> : M <sub>1</sub>	T : T
4 x 10	2 : 1	1 : 3.2	2 : 1	1 : 3.2	1 : 3.25	1.68: 1	64.8: 1	10.1: 1	64.8: 1	10.1: 1	9.92: 1	54.7: 1
4 x 10 <sup>2</sup>	2 : 1	1 : 3.2	2 : 1	1 : 3.2	1 : 3.25	1.68: 1	26.9: 1	4.18: 1	26.9: 1	4.18: 1	4.07: 1	22.7: 1
4 x 10 <sup>3</sup>	1.53: 1	1 : 2	1.53: 1	1 : 2	1 : 2	1.37: 1	19 : 1	6.2 : 1	19 : 1	6.2 : 1	6.2 : 1	17 : 1
4 x 10 <sup>4</sup>	2 : 1	1 : 2	2 : 1	1 : 2	1 : 2.6	1.67: 1	24.7: 1	6.15: 1	24.7: 1	6.15: 1	4.7 : 1	20.7: 1
4 x 10 <sup>5</sup>	1.93: 1	1 : 1.3	1.93: 1	1 : 1.3	1 : 1.16	1.83: 1	21.9: 1	8.5 : 1	21.9: 1	8.5 : 1	9.7 : 1	20.8: 1
4 x 10 <sup>6</sup>	1.46: 1	1 : 1.3	1.46: 1	1 : 1.3	1 : 2.5	1.32: 1	15.6: 1	8.2 : 1	15.6: 1	8.2 : 1	4.28: 1	14.2: 1



#### III.4 INFLUENCIA DEL PROCESO DE ELABORACION DEL YOGUR SOBRE LA AFLATOXINA M<sub>1</sub>

La leche original, antes de proceder a su contaminación, se mostró libre de aflatoxinas.

En la tabla III.58 se recogen los niveles de aflatoxina detectados en la leche recién contaminada, y en las distintas etapas de elaboración y almacenamiento en refrigeración del yogur.

Tabla III.58 .- Aflatoxina M<sub>1</sub> detectada a lo largo del proceso de elaboración del yogur y almacenamiento en refrigeración

	AFLATOXINA M <sub>1</sub>		
	µg / 50g	ppb	%
Leche contaminada	0.25	5	100
Yogur tras 7 horas incubación a 45°C	0.3	6	120
Yogur tras 17 horas incubación a 45°C	0.24	4.8	96
Yogur tras 24 horas almacenamiento a 4°C	0.24	4.8	96
Yogur tras 7 días almacenamiento a 4°C	0.24	4.8	96
Yogur tras 10 días almacenamiento a 4°C	0.25	5	100
Yogur tras 15 días almacenamiento a 4°C	0.25	5	100
Yogur tras 21 días almacenamiento a 4°C	0.24	4.8	96

### III.5. PRODUCCION DE AFLATOXINAS SOBRE QUESO MADURADO

En el momento de la recepción de la leche en el laboratorio, se procedía a la determinación del pH, con objeto de comprobar sus características higiénicas; este pH presentó un valor entre 6.2 y 6.5 en todos los casos, cifra considerada como normal.

Para la toma de muestras de los distintos quesos, se procedía al troceado de los mismos; las porciones así obtenidas serán denominadas con el número de queso correspondiente seguido de un guión y una letra correlativa en las piezas obtenidas de un mismo queso.

III.5.a. Inoculación de la leche de partida con una suspensión de esporas de A. parasiticus NRRL 2999

Se estudiaron 2 lotes dentro de este tipo de inoculación.

III.5.a.1. Estudio de la distribución de esporas durante el proceso de elaboración del queso Madurado

Las esporas fueron incorporadas a la leche en una solución Ringer al 1/4 con Tween B0; durante el proceso de elaboración del queso, las esporas se distribuyeron en cuanto a su número

total con preferencia en suero sobre cuajada; en cálculos por unidad de peso o volumen, las cosas suceden al contrario; si tenemos en cuenta la diferencia en cuanto a la cantidad de suero y cuajada obtenidos, podemos concluir la distribución uniforme de las esporas entre suero y cuajada.

En la tabla III.59 podemos apreciar los valores obtenidos por nosotros en cuanto a la distribución de esporas de A. Parasiticus en los 2 lotes elaborados.

Durante el proceso de elaboración del queso, se produjo una pérdida de esporas, del 34% en uno de los lotes y del 72% en el otro.

#### III.5.a.2. Estudio de la producción de aflatoxinas

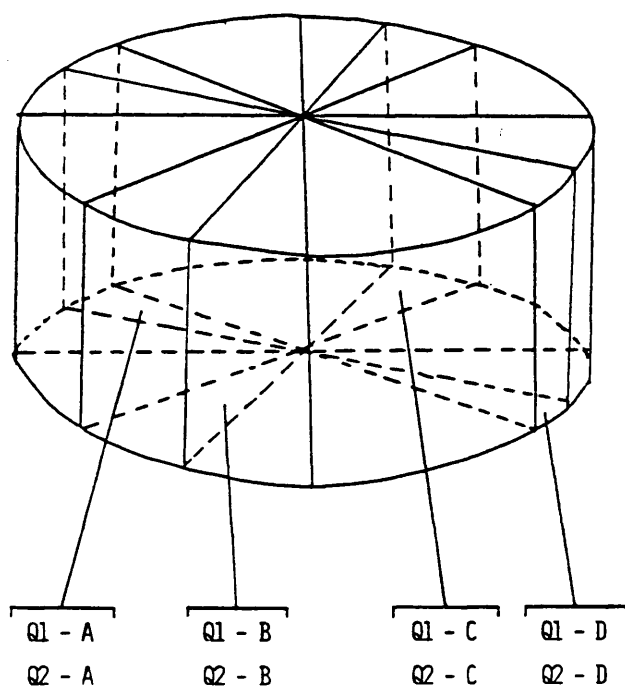
A/ Quesos parafinados: Q1 y Q2, tras 15 días de madurado, no presentaban crecimiento externo visible del hongo aflatoxicogénico; en este momento, se parafinaron y continuó su madurado. Q1 es troceado a los 30 días de madurado. En Q2 se dejó cumplir el tiempo de madurado (60 días), al cabo del cual se trocó de la misma forma que Q1, siguiendo el esquema de la figura III.1, donde se señalan las distintas porciones obtenidas con su peso correspondiente.

En ninguno de los 2 quesos se apreció crecimiento fúngico en su interior. Cada una de las piezas indicadas en dicha figura, era a su vez dividida en 2 porciones aproximadamente iguales, y extraída para aflatoxinas.

Tabla III.59 .- Distribución de esporas de A.parasiticus en suero/cuajada durante el proceso de elaboración del queso Madurado

	LOTE 1		LOTE 2	
	Esporas por unidad de peso o volumen	Esporas totales	Esporas por unidad de peso o volumen	Esporas totales
Leche de partida	$3.2 \times 10^2 / \text{ml}$	$56 \times 10^5$	$21.5 \times 10^2 / \text{ml}$	$377.6 \times 10^5$
Suero	$2 \times 10^2 / \text{ml}$	$31 \times 10^5$	$2.5 \times 10^2 / \text{ml}$	$92.4 \times 10^5$
Cuajada	$3 \times 10^2 / \text{g}$	$6 \times 10^5$	$6 \times 10^2 / \text{g}$	$11.19 \times 10^5$

Figura III.1 .- Esquema de troceado de los quesos Q1 y Q2 (quesos pafinados con inoculación de la leche de partida por una suspensión de esporas



En ninguna de las piezas analizadas se llegó a determinar la presencia de aflatoxinas.

B/ Quesos sin parafinar y salados por inmersión en salmuera estéril: Ambos quesos (Q3 y Q4), se dejaron madurar durante 60 días a 15° C, al cabo de los cuales presentaban escaso crecimiento fúngico externo, tanto de Aspergillus como de Penicillium. En su parte inferior (en contacto con la bandeja de la estufa), el crecimiento fue más intenso, pero en ningún caso abundante. Ambos quesos se trocearon según el esquema de la figura III.2, donde se hace constar la cantidad de aflatoxina determinada en aquellas porciones que resultaron ser positivas a su presencia. No se apreció crecimiento interno visible. Como se puede apreciar en esta figura, únicamente se encontraron aflatoxinas en las porciones de queso más externas, y de éstas únicamente en la correspondiente a la parte inferior del queso, es decir, aquélla que había presentado un crecimiento más intenso.

En la tabla III.60 se pueden apreciar los resultados obtenidos de la producción de aflatoxinas sobre queso Madurado cuando la leche de partida es contaminada con una suspensión de esporas.

En resumen, en los quesos parafinados a los 15 días del inicio de su madurado no se apreció producción de aflatoxinas, cosa que sí sucede, aunque en baja cantidad, en los no parafinados. En este caso es de destacar el nivel

Figura III.2 .- Esquema de troceado y porciones positivas a aflatoxinas de los quesos Q3 y Q4 (quesos sin parafinar y salados en salmuera estéril con inoculación de la leche de partida por una suspensión de esporas )

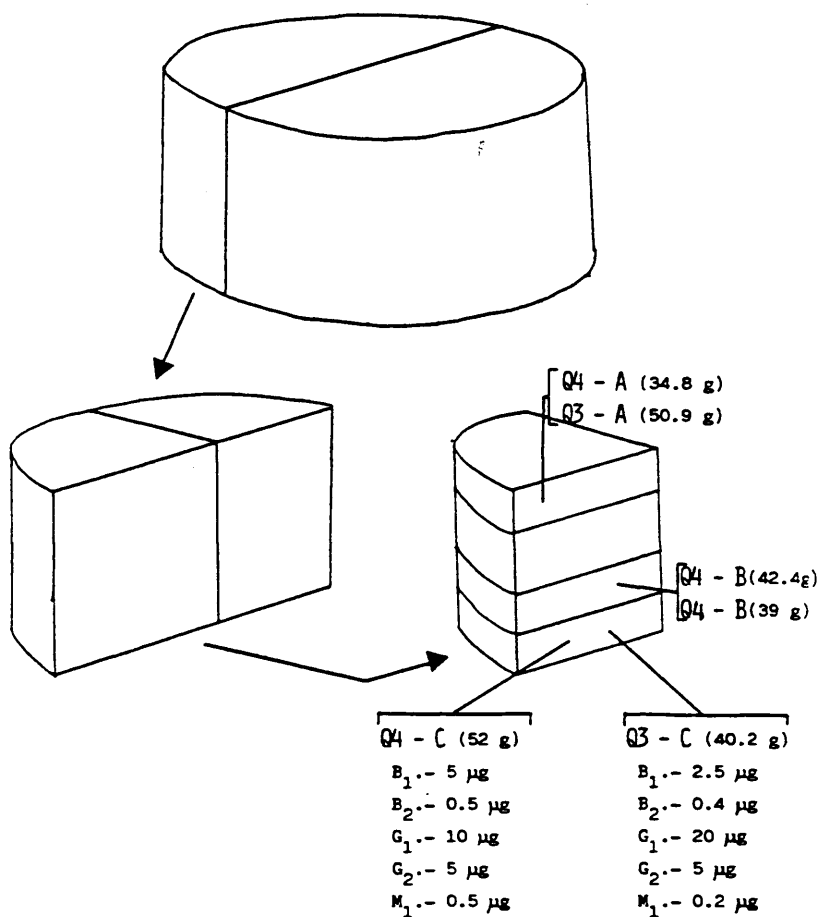




Tabla III.60 .- Producción de aflatoxinas sobre queso Madurado con Inoculación de la leche de partida con una suspensión de esporas de A.parasiticus

Queso	AFLATOXINAS ( µg / g )							
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total	B <sub>1</sub> / G <sub>1</sub>	B <sub>1</sub> / B <sub>2</sub> / G <sub>1</sub> / G <sub>2</sub> / M <sub>1</sub>
Q1	-	-	-	-	-	-	-	-
Q2	-	-	-	-	-	-	-	-
Q4 *	0.0961	0.00961	0.192	0.0961	0.00961	0.4034	1 / 1.99	10 / 1 / 19.9/ 10/ 1
Q3 *	0.062	0.0099	0.497	0.164	0.0049	0.7378	1 / 8.01	12.65/2.02/101.4/33.4/1

\* .- Capa superior de 10mm.

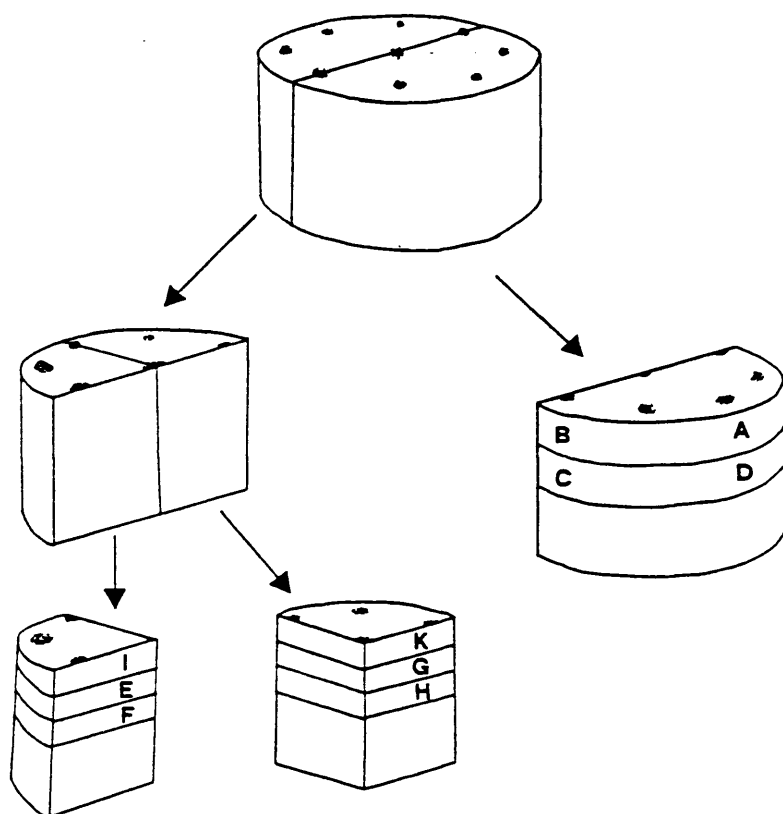
superior de producción de  $G_1$  con respecto a  $B_1$ , y lo que es más sorprendente, la elevada cantidad de  $G_2$  presente, al nivel de  $B_1$  e incluso superior.

#### III.5.b. Inoculación en la superficie del queso con asa cargada

En estos quesos, tras la inoculación se aprecia crecimiento, tanto de la cepa inoculada de Aspergillus como de Penicillium contaminante. Esto hizo que alguno de los quesos tuviera que ser limpiado a los 12 días con un paño húmedo, proceso que no se llevó a cabo en otros con objeto de estudiar la influencia del crecimiento competitivo sobre la capacidad de producción de aflatoxinas. En los quesos limpiados, el Penicillium fue eliminado fácilmente, mientras que el Aspergillus quedó incrustado en la corteza en los puntos de inoculación, como si al secarse la misma hubiera englobado el micelio inoculado.

A/ Queso no limpiado y parafinado: Q6. Crecimiento abundante de Penicillium, apareciendo pequeños focos de Aspergillus detectables por la existencia de un micelio amarillento, tras los primeros 15 días de madurado; en este punto se parafina, deteniéndose con ello el crecimiento. Finalizados los 60 días de madurado, se procedió al troceado del queso según el esquema de la figura III.3, extrayendo de las porciones: Q6-B

Figura III.3 .- Esquema de troceado de los quesos Q5, Q6, Q7, Q8, Q9, Q10 y Q11 (inoculación en la superficie del queso con asa cargada)



(52.02g), Q6-I (31.293g) y Q6-K (38.65g). Estas 3 porciones resultaron ser negativas a la presencia de aflatoxinas, a pesar de los pequeños focos de crecimiento micelial apreciados.

E/ Quesos limpiados y parafinados: Q5 y Q7. En el momento de ser limpiados, a los 12 días, aparecen con un aspecto similar al indicado para Q6; con dicha limpieza se consigue la eliminación de los hongos crecidos. Se continuó la maduración 3 días más, sin repetir la inoculación, momento en el que se parafinó. Q7 se dejó madurando 30 días, y Q5 hasta que completó los 60 días. Al cabo de este tiempo son troceados según el esquema de la figura III.3.

Las siguiente piezas resultaron ser negativas a la presencia de aflatoxinas:

- Q5.- Q5-B (56.83g), Q5-I (27.743g), Q5-K (31.53g).
- Q7.- Q7-C (77.48g), Q7-D (61.39g).

Dentro de Q7, 2 porciones resultaron positivas, presentando aflatoxinas en las cantidades indicadas a continuación:

- Q7-B (73.04g)
  - B<sub>1</sub>- 0.08 µg
  - B<sub>2</sub>- 0.01 µg
  - G<sub>1</sub>- 0.6 µg
  - G<sub>2</sub>- 0.06 µg
  - M<sub>1</sub>- 0.009 µg

•Q7-A (53.77g)	B <sub>1</sub> - 0.03 µg
	B <sub>2</sub> - 0.0098 µg
	G <sub>1</sub> - 0.2 µg
	G <sub>2</sub> - 0.06 µg
	M <sub>1</sub> - 0.0094 µg

En resumen, aflatoxinas en muy bajas cantidades fueron detectadas en el queso madurado durante 30 días, y no pudieron ser puestas de manifiesto cuando dicho madurado se completó. En el primer caso (Q7) sólo se llegaron a determinar en la capa superior de 10 mm.

C/ Queso limpiado y sin parafinar: Q9. Este queso se limpió a los 12 días del abundante crecimiento de Penicillium que presentaba en su superficie, y del ligero de Aspergillus: tras la limpieza, el Aspergillus quedó en los puntos de inoculación como incrustado en la corteza. No se repitió la inoculación tras la limpieza, no apreciándose desarrollo fúngico. Se dejó madurar 60 días a 15°C, tras lo cual se trocó según el esquema de la figura III.3. Se analizaron para aflatoxinas las porciones Q9-B (52.66g), Q9-I (28.6g) y Q9-K (26.7g), resultando todas ellas negativas a la presencia de dichos compuestos tóxicos.

D/ Queso sin limpiar y sin parafinar: Q8. Presentó abundante crecimiento de Penicillium, que fue cubriendo poco a poco los pequeños focos de desarrollo de Aspergillus. Tras los 60 días de madurado, el crecimiento de Penicillium englobaba todo el queso, procediéndose al troceado siguiendo la figura III.3 y extrayendo de las porciones Q8-B (45.14g), Q8-I (28.4g) y Q8-K (24.67g), todas ellas negativas a aflatoxinas.

E/ Quesos salados en salmuera estéril y sin parafinar: Q10 y Q11. Tras 30 días de madurado, el crecimiento resultó ser prácticamente nulo; el micelio se encontraba únicamente en la zona de inoculación, pero sin desarrollarse a partir de ella; por ello, el queso Q11 se inoculó de nuevo y se llevó a 28°C en una jarra de plástico estéril cubierta con papel de aluminio, donde se mantuvo 30 días. Este mismo procedimiento se llevó a cabo con Q10 tras los 60 días de madurado.

- En Q11, al final del periodo de incubación, presentó abundante crecimiento de Aspergillus, que recubría la mayor parte del queso, apareciendo también Penicillium, pero en menor medida. Se efectuó el troceado según el esquema de la figura III.3, obteniendo los siguientes valores en cuanto a detección de aflatoxinas en cada una de las piezas obtenidas:

•Q11-I (45g)	E <sub>1</sub> -	17.7 µg
	E <sub>2</sub> -	1 µg
	G <sub>1</sub> -	28.5 µg

- 326 -

G<sub>2</sub>- 4 µg  
M<sub>1</sub>- 0.3 µg

•Q11-K (33g)      B<sub>1</sub>- 1 µg  
                     B<sub>2</sub>- 0.4 µg  
                     G<sub>1</sub>- 2 µg  
                     G<sub>2</sub>- 0.6 µg  
                     M<sub>1</sub>- 0.09 µg

•Q11-E (24g)      B<sub>1</sub>- 0.065 µg  
                     G<sub>1</sub>- 0.1 µg

•Q11-G (22.7g)    B<sub>1</sub>- 0.065 µg  
                     G<sub>1</sub>- 0.1 µg

En Q11-H (25.9g) y Q11-F (23.6g) no se detectó presencia de aflatoxinas.

En el curso de estos estudios, por tanto, se detectó una profundización de aflatoxinas superior a 10 mm desde la superficie del queso. En la tercera porción de 10 mm ya no fueron detectadas.

- En Q10, una vez cumplido su periodo de incubación, no presentó crecimiento de Penicillium, sino sólo de Aspergillus, pero no de forma abundante, sino como una fina película que recubría todo el queso. Se troceó el queso según el esquema de la figura III.3., extrayendo de las siguientes

porciones:

•Q10-I (19.1g)	B <sub>1</sub> -	36.6 µg
	B <sub>2</sub> -	1 µg
	G <sub>1</sub> -	40 µg
	G <sub>2</sub> -	1 µg
	M <sub>1</sub> -	0.67 µg

•Q10-K (16.2g)	B <sub>1</sub> -	0.14 µg
	G <sub>1</sub> -	0.4 µg

La porción Q10-F (21.3g) resultó negativa a la presencia de aflatoxinas.

En la tabla III.61 podemos apreciar los resultados obtenidos dentro de la producción de aflatoxinas en queso con inoculación en su superficie con asa cargada. En esta tabla no se incluyen los quesos en que no se detectó la presencia de aflatoxinas.

En esta tabla se puede apreciar la posibilidad de difusión de aflatoxinas hacia el interior del queso, en una medida superior a 10 mm; esto sucedió cuando el queso se mantuvo a una temperatura superior a la de madurado, y óptima a su vez para el desarrollo del hongo.

Como queda reflejado en la columna de proporción de aflatoxinas producidas, cuando el queso es mantenido a 15°C



Tabla III.61 .- Producción de aflatoxinas sobre queso Madurado con inoculación en superficie con asa cargada

A F L A T O X I N A S ( $\mu\text{g}$ / g )									
Queso	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total	B <sub>1</sub> : G <sub>1</sub>	B <sub>1</sub> / B <sub>2</sub> / G <sub>1</sub> / G <sub>2</sub> / M <sub>1</sub>	
Q7	a	0.001	0.00013	0.0082	0.0017	0.00012	0.01115	1 : 8.2	8.3 / 1.08/ 68.3/ 14.1/ 1
		0.00055	0.00018	0.0037	0.0011	0.00017	0.0057	1 : 6.72	3.2 / 1.05/ 21.7/ 6.47/ 1
Q11	a	0.393	0.022	0.63	0.088	0.0066	1.1396	1 : 1.6	59.5 / 3.3 / 95.4/ 13.3/ 1
		0.03	0.012	0.06	0.018	0.0027	0.1227	1 : 2	11.1 / 4.4 / 22.2/ 6.6 / 1
	b	0.0027	-	0.0041	-	-	0.0068	1 : 1.5	-
Q10		0.0029	-	0.0044	-	-	0.0073	1 : 1.5	-
	a	1.91	0.052	2.09	0.052	0.035	4.139	1 : 1.09	54.5 / 1.48/ 59.7/ 1.48/ 1
	b	0.0086	-	0.024	-	-	0.0326	1 : 2.79	-

a: Capa superior de 10mm  
b: Segunda capa de 10mm

Q7: queso limpiado y parafinado madurado 30 días  
Q11: queso enlaido en salmuera estéril, no parafinado, madurado 30 días.  
Incubado a 28°C 30 días.  
Q10: IDEM madurado 60 días.

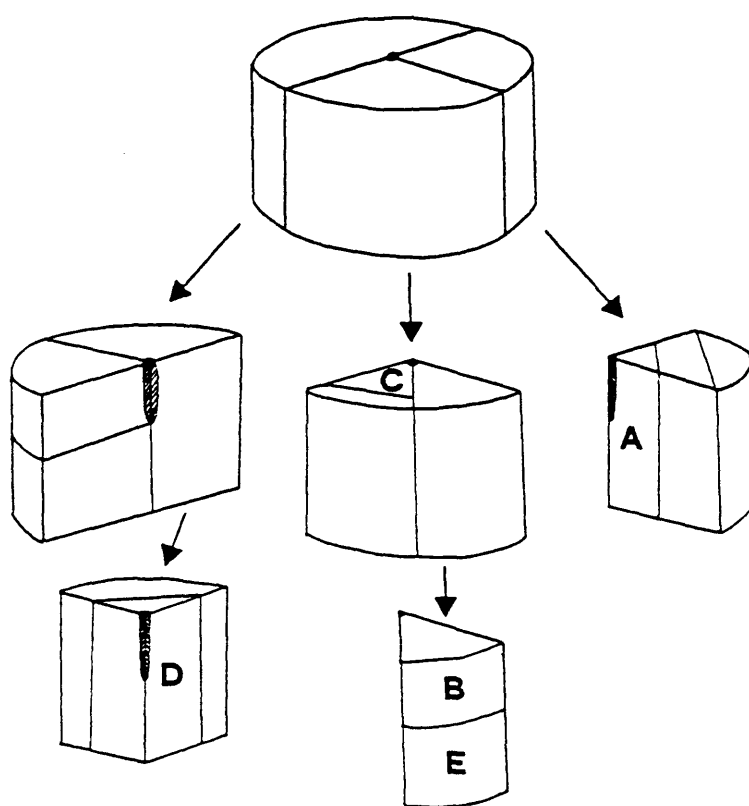
(Q7) existió mucha mayor producción de G que de B, siendo superior incluso el valor de G<sub>2</sub> que el de B<sub>1</sub>. Esto no sucedió cuando el queso se incubó a 28°C, en que si bien existió mayor producción de G<sub>1</sub> que de B<sub>1</sub>, no alcanzó los valores que se pueden apreciar a 15°C, y en ningún caso existió mayor producción de G<sub>2</sub> que de B<sub>1</sub>.

#### III.5.c. Inoculación en el centro del queso

Dentro de este tipo de inoculación fueron estudiados 4 quesos, 3 de ellos parafinados a los 15 días de maduración, y troceados para la extracción de aflatoxinas al cumplirse los días 30 (Q12), 45 (Q14) y 60 (Q13). Un queso más (Q15) no fue parafinado, manteniéndose 60 días en maduración.

Todos los quesos fueron troceados según el esquema de la figura III.4. En cada uno de ellos se procedió a la extracción de las piezas A, B, C, D y E, siendo todas ellas y en todos los quesos, negativas a la aparición de aflatoxinas. Esto a pesar de que a lo largo de la zona de inoculación apareció ligero crecimiento fúngico de color amarillento correspondiente al Aspergillus inoculado.

Figura III.4 .- Esquema de troceado de los quesos Q12, Q13, Q14 y Q15  
(inoculación en el centro del queso)



#### III.5.d. Producción de aflatoxinas sobre porciones de queso

Se utilizaron porciones tanto de queso elaborado por nosotros como de queso comercial. Los resultados obtenidos pueden ser apreciados en la Tabla III.62.

A una de las porciones (T7-B), le fue quitada su capa externa de aproximadamente 5 mm, con objeto de comprobar la posible difusión de aflatoxinas a la misma.

En las porciones incubadas a 28 °C, a los 6 días el crecimiento fúngico ya es intenso, cubriendo toda la superficie del queso, con esporulación abundante. En algunos casos, sin aparente relación con el hecho de tratarse de queso comercial o elaborado por nosotros, se apreció crecimiento de Penicillium junto con la cepa inoculada, ligero en aquellos incubados a 28°C y más intenso a 15 y 10°C.

A 10°C tras 50 días de incubación no apareció crecimiento de Aspergillus, ni por supuesto, producción de aflatoxinas.

La proporción de aflatoxinas B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub> se mostró ligeramente favorable a esta última en todas las determinaciones efectuadas en queso comercial (días 6, 13 y 20 a 28°C, y 30 y 50 a 15°C), y a los 20 días a 28°C en queso elaborado por nosotros; en cambio, en este último tipo, proporciones muy superiores de G<sub>1</sub> fueron detectadas en los primeros días (8 y 10) de incubación. En ningún caso se llegó a determinar más G<sub>2</sub> que B<sub>1</sub>.

Tabla III.62 .- Producción de aflatoxinas sobre porciones de queso

Temp.	Porción	tiempo en días	AFLATOXINAS ( µg / g)									
			B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total	B <sub>1</sub> : G <sub>1</sub>	B <sub>1</sub> / B <sub>2</sub> / G <sub>1</sub> / G <sub>2</sub> / M <sub>1</sub>		
28°C	T1-A	8	1.85	0.37	14.8	1.48	0.24	18.74	1 : 8	7.7 / 1.5 / 61.6/ 6.1 / 1		
	T1-B	8	4.03	2.42	24.24	3.03	1.21	34.93	1 : 6	3.3 / 2 / 20 / 2.5 / 1		
	T2	11	8.33	2.77	83.3	4.16	2.1	100.66	1 : 10	3.96/ 1.31/ 39.6/ 1.98/ 1		
	T3-A	20	8	1	20	3.2	0.8	33	1 : 2.5	10 / 1.25/ 25 / 4 / 1		
	T3-B	20	8	0.4	20	2.66	0.4	31.46	1 : 2.5	20 / 1 / 50 / 6.65/ 1		
28°C	T6-A	6	4	0.16	8	0.32	0.11	12.59	1 : 2	36.3/ 1.45/ 72.7 / 2.9 / 1		
	T6-B	13	40	4	80	5.33	2.66	131.99	1 : 2	15 / 1.5 / 30 / 2 / 1		
	T7-A <sup>a</sup>	20	32	8	53.32	16	2	111.32	1 : 1.66	16 / 4 / 26.6/ 8 / 1		
	T7-B <sup>b</sup>	20	7.74	1.16	11.62	4.65	0.38	25.55	1 : 1.5	20.3/ 3 / 30.5/ 12.2/ 1		
	T8	30	0.0052	-	0.0052	0.0015	-	0.0119	1 : 1	-		
15°C	T9	50	0.029	0.0088	0.11	0.0058	0.0057	0.2115	1 : 3.79	5 / 1.5 / 19.2/ 1.01/ 1		
10°C	T10/T11	50	-	-	-	-	-	-	-	-		

a.- Porción entera

b.- Porción entera eliminando 5 mm de capa externa

#### III.5.e. Producción de aflatoxinas sobre queso triturado

Todos estos estudios se llevaron a cabo a partir de queso elaborado por nosotros, que era convertido en pequeños gránulos con la ayuda de un mortero.

En las muestras incubadas a 28 °C aparecían zonas de crecimiento de Aspergillus y Penicillium, con micelio muy abundante. En la muestra incubada a 15 °C únicamente se observó crecimiento visible de Penicillium, siendo nula la presencia de aflatoxinas.

A 28 °C se detectó producción en igual nivel de B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub>, así como por otra parte de B<sub>2</sub> y G<sub>2</sub>. Los resultados pueden ser apreciados en la tabla III.63.

#### III.5.f. Producción de aflatoxinas sobre pasta de queso

Esta pasta fue elaborada por granulación del queso en un mortero, añadiendo a 100g de este granulado, 100 ml de agua destilada estéril. Una vez cumplido el periodo de incubación, se separaban micelio y substrato, procediendo a su extracción para aflatoxinas.

A 28 °C apareció un crecimiento muy abundante de la cepa inoculada, con una gruesa capa de micelio sobre el substrato. La esporulación fue abundante. El substrato aparecía con una pigmentación amarillenta característica.

Tabla III.63 .- Producción de aflatoxinas sobre queso triturado

A F L A T O X I N A S   (   µg / g )									
Temp.	tiempo en días	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total	B <sub>1</sub> : G <sub>1</sub>	B <sub>1</sub> / B <sub>2</sub> / G <sub>1</sub> / G <sub>2</sub> / M <sub>1</sub>
28°C	8	40	2.66	40	2.66	1.6	86.92	1 : 1	25 / 1.66/ 25 / 1.66/ 1
	11	66.64	10	66.64	10	5	158.28	1 : 1	13.3/ 2 / 13.3/ 2 / 1
15°C	20	-	-	-	-	-	-	-	-

A 15 °C el crecimiento también resultó ser abundante, si bien con menores zonas de esporulación. Aparecían pequeños focos de Penicillium .

A 10 °C hay crecimiento de Aspergillus , en menor medida que a las otras temperaturas, pero llegando a cubrir todo el substrato en el matraz. A pesar de esto, como podemos apreciar en la tabla III.64, no se pudo detectar la presencia aflatoxinas, ni en substrato ni en micelio.

En la tabla III.65 se puede apreciar la distribución de aflatoxinas entre micelio y substrato en las distintas condiciones investigadas.





Tabla III.65 .- Distribución de aflatoxinas en micelio/substrato en pasta de queso

AFLATOXINAS g micelio / g substrato							
Temp.	tiempo en días	B <sub>1</sub> : B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub> : B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub> : G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub> : G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub> : M <sub>1</sub>	Total : Total
28°C	11	1 : 1.48	1 : 1.55	4.1 : 1	1 : 1.55	1.97 : 1	2.26 : 1
15°C	16	5.4 : 1	6.5 : 1	11.25 : 1	1.97 : 1	5.5 : 1	9.06 : 1

### III.6. INFLUENCIA DEL PROCESADO DEL QUESO MADURADO SOBRE SU CONTENIDO EN AFLATOXINAS

Al expresar los resultados obtenidos en nuestras experiencias, haremos distinción entre lote 1 y 2, dada la diferencia habida entre ambos en cuanto al proceso de elaboración seguido.

Debemos hacer constar que la leche de partida en ambos lotes mostró un contenido nulo en aflatoxinas.

A continuación iremos desgranando los resultados obtenidos en los distintos estudios llevados a cabo.

#### III.6.a. Lote 1

Como ya indicamos dentro del apartado correspondiente de la metodología, en este lote, tras la adición de las aflatoxinas y el starter, se dejaba en reposo durante 30 minutos, con objeto de conseguir una mayor acidificación; en este tiempo el pH pasa de 6.3 a 6.1; también se conseguiría una mejor distribución de las aflatoxinas en la leche.

III.6.a.1. Influencia de las aflatoxinas sobre las bacterias presentes en leche y cultivo iniciador

Tratamos de investigar el posible efecto que las aflatoxinas añadidas a la leche pudieran tener sobre el desarrollo tanto de las bacterias presentes en la leche, como fundamentalmente de las que constituyen el starter.

En la tabla III.66 se muestran los recuentos de mesófilos aerobios presentes en leche de partida, leche + cuajo, suero y cuajada, efectuados en la leche contaminada con aflatoxinas y en la que serviría para la elaboración de quesos controles.

En el caso de leche + cuajo con aflatoxinas se produce un incremento en el recuento de mesófilos aerobios con respecto al queso control. También existen diferencias en cuanto a la distribución de las bacterias, inclinada hacia la cuajada en el queso control y hacia el suero en el queso con aflatoxinas.

III.6.a.2. Influencia del proceso de elaboración del queso Madurado sobre las aflatoxinas presentes en la leche de partida

Podemos apreciar los resultados obtenidos en la tabla III.67. Para todas las aflatoxinas estudiadas, la distribución suero/cuajada fue claramente favorable hacia el suero,

Tabla III.66 .- Recuento de mesófilos aerobios a lo largo del proceso de elaboración de queso control y queso contaminado con aflatoxinas

	queso contaminado		queso control	
	por unidad de peso o volumen	Total	por unidad de peso o volumen	Total
Leche	$31 \times 10^3$ / ml	$54.25 \times 10^7$	$74.43 \times 10^3$ / ml	$13.9 \times 10^8$
Leche + Cuajo	$1360 \times 10^6$ / ml	$23800 \times 10^9$	$2.51 \times 10^6$ / ml	$44 \times 10^9$
Suero	$536 \times 10^6$ / ml	$7423.6 \times 10^9$	$1 \times 10^5$ / ml	$1.2 \times 10^9$
Cuajada	$47 \times 10^5$ / g	$7.2 \times 10^9$	$5.01 \times 10^6$ / g	$25 \times 10^9$

Tabla III.67 .- Influencia del proceso de elaboración del queso Madurado sobre las aflatoxinas presentes en la leche de partida en el Lote 1

		AFLATOXINAS				
		B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>
49 ml de la sol. contaminante	µg	41.65	41.65	29.4	29.4	14.7
leche original	µg	-	-	-	-	-
leche tras la contaminación (17.5L)	µg	46.6	46.6	28	28	14
	% *	100	100	100	100	100
	µg/L	2.6	2.6	1.6	1.6	0.8
Suero (13.85L)	µg	27.7	27.7	13.85	13.85	9.23
	%	59.44	59.44	49.46	49.46	65.92
	µg/L	2	2	1	1	0.66
Cuajada (1784g)	µg	14.272	14.272	5.352	5.352	3.05
	%	30.62	30.62	19.11	19.11	21.78
	µg/Kg	8	8	3	3	1.71
Enriquecimiento en afl. del queso		3.076	3.076	1.875	1.875	2.137
Perdidas en afl. en suero + cuajada	%	9.94	9.94	31.43	31.43	12.3

\* : Consideramos como 100% los valores hallados en la leche tras la contaminación.

fundamentalmente para la aflatoxina  $M_1$  (65.92/21.78). Resultados no tan inclinados hacia el suero fueron hallados para aflatoxina B (59.44/30.62) y G (49.46/19.11).

Las pérdidas en aflatoxinas  $G_1$  y  $G_2$  habidas durante el proceso de elaboración pueden ser consideradas como altas (31.43%), siendo normales las de B y  $M_1$  (9.94 y 12.3 % respectivamente). Debido a estas pérdidas, el grado de enriquecimiento de la cuajada es variable, de un 1.875 en G, 2.137 en  $M_1$  y 3.076 en B.

#### III.6.a.3. Influencia del periodo de maduración sobre las aflatoxinas presentes en queso Madurado

Los resultados obtenidos en el curso de estas experiencias pueden ser apreciados en la tabla III.6B.

En cuanto a las aflatoxinas  $B_1$  y  $B_2$ , se muestra estabilidad durante los 60 días de madurado, con una ligera disminución a los 15 días. Esta misma estabilidad se aprecia para la  $M_1$ , con ligeras oscilaciones, pero lo suficientemente tenues como para considerar su no degradación. Por contra, los altos valores de  $G_1$  y  $G_2$  encontrados a los 60 días de madurado parecen excesivos.

Como puede apreciarse, en ninguna de las aflatoxinas se encontró diferencia entre porción interna y externa a los 60 días de madurado.





III.6.a.4. Influencia del almacenamiento en refrigeración del queso Madurado sobre su contenido en aflatoxinas

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla III.69. Para comentar estos resultados es obligado referirse a la tabla III.68 referente a la influencia del madurado. Las aflatoxinas  $B_1$  y  $B_2$  van disminuyendo a lo largo del almacenamiento en refrigeración, hasta llegar a un 60% de recuperación a los 60 días; como excepción, a estos mismos 60 días en la porción interna se recupera de nuevo la totalidad de las aflatoxinas. Algo similar sucede con  $G_1$  y  $G_2$ , que van disminuyendo hasta el día 30, para tomar un considerable aumento en el día 60, fundamentalmente en la porción interna, con un 266% de aflatoxina recuperada. En cuanto a la aflatoxina  $M_1$ , menores oscilaciones fueron apreciadas, si bien siguiendo esa misma frecuencia, de disminución primero y aumento a los 60 días. Hay que destacar que de las 4 aflatoxinas principales,  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$  y  $G_2$ , a los 60 días, y tanto en la porción interna como en la externa, se recuperan exactamente las mismas cantidades de cada una de ellas, aunque evidentemente suponiendo un distinto porcentaje con respecto a las toxinas inicialmente presentes en el queso.

Tabla III.69 .- Influencia del almacenamiento en refrigeración del queso Madurado sobre su contenido en aflatoxinas en el lote 1

AFLATOXINAS							
tiempo en días	R <sub>1</sub> µg/kg	%	R <sub>2</sub> µg/kg	%	G <sub>1</sub> µg/kg	%	M <sub>1</sub> µg/kg
15	6.72	84	6.72	84	3.36	112	1.34
	6.6	83	6.6	83	4	133	1.25
30	5.58	69.75	5.58	69.75	2.14	71.3	1.26
	5.1	63.75	5.1	63.75	1.5	50	1.418
60	8	100	8	100	8	266	2
	4.8	60	4.8	60	4.8	160	2

Consideramos como 100% el valor hallado en la cuajada bien exprimida

III.6.a.5. Influencia del almacenamiento en congelación del queso Madurado sobre su contenido en aflatoxinas

A la vista de los resultados expresados en la tabla III.70, se puede apreciar la estabilidad de las aflatoxinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> a lo largo de los 60 días de congelación, con una ligera disminución a los 10 días. En cuanto a G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>, con excepción de la muestra tomada a las 24h, se va produciendo un aparente incremento, que no es tal por cuanto si nos referimos al momento en que finaliza el madurado, las aflatoxinas serán estables hasta el día número 30, para producirse un incremento en el día 60. Esto mismo se puede decir para la aflatoxina M<sub>1</sub>.

III.6.b. Lote 2

En este caso el proceso de elaboración del queso fue continuo, sin esperar esos 30 minutos de reposo para conseguir una mayor acidificación.

III.6.b.1. Influencia del proceso de elaboración del queso Madurado sobre las aflatoxinas presentes en la leche de partida

Podemos apreciar los resultados obtenidos en la tabla III.71. Para todas las aflatoxinas la distribución suero/cuajada fue



Tabla III.71 .- Influencia del proceso de elaboración del queso Madurado sobre las aflatoxinas presentes en la leche de partida en el Lote 2

		AFLATOXINAS				
		B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>
leche original		-	-	-	-	-
leche tras la contaminacion (20L)	µg	46.67	46.67	28.35	28.35	8.01
	% *	100	100	100	100	100
	µg/L	2.33	2.33	1.41	1.41	0.4
Suero (15.6L)	µg	31.2	31.2	12.48	12.48	5.46
	%	66.85	66.85	44.02	44.02	68.1
	µg/L	2	2	0.8	0.8	0.35
Cuajada (1853g)	µg	11.118	11.118	7.412	7.412	1.71
	%	23.82	23.82	26.14	26.14	21.34
	µg/Kg	6	6	4	4	0.92
Enriquecimiento en afl. de la cuajada		2.57	2.57	2.83	2.83	2.3
Perdidas en afl. en suero + cuajada	%	9.32	9.32	29.83	29.83	10.48

\*: Consideramos como 100% los valores hallados en leche tras la contaminacion

favorable hacia el suero, alcanzando su máxima diferencia para la aflatoxina M<sub>1</sub> (68.1/21.34). Valores similares se obtuvieron para aflatoxina B (66.85/23.82), y con menores diferencias entre suero/cuajada para aflatoxina G (44.02/26.14). Las pérdidas habidas en aflatoxinas G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> pueden considerarse altas (29.83%), siendo normales las de B (9.32%) y M<sub>1</sub> (10.48%). A pesar de estas pérdidas, el enriquecimiento en aflatoxinas de la cuajada es similar para todas ellas, con un valor comprendido entre 2.3 a 2.87.

III.6.b.2. Influencia del periodo de maduración y almacenamiento en refrigeración sobre las aflatoxinas presentes en queso Madurado

Los resultados obtenidos aparecen descritos en la tabla III.72.

A los 60 días de madurado podemos considerar la estabilidad de las aflatoxinas, lo mismo que tras mantener en refrigeración este mismo periodo de tiempo. A los 90 días se produce un ligero incremento en la recuperación de todas las aflatoxinas estudiadas. En este caso no se produce el hecho reflejado en el Lote 1, en cuanto a igualdad en la recuperación de las 4 aflatoxinas principales tras 60 días de almacenamiento en refrigeración.

Tabla III.72 .- Influencia del periodo de maduración y almacenamiento en refrigeración sobre las aflatoxinas presentes en queso Madurado en el Lote 2

AFLATOXINAS										
tiempo en dias	B <sub>1</sub>		B <sub>2</sub>		G <sub>1</sub>		G <sub>2</sub>		M <sub>1</sub>	
	µg/kg	%	µg/kg	%	µg/kg	%	µg/kg	%	µg/kg	%
0 ° madurado	6	100	6	100	4	100	4	100	0.92	100
	6	100	6	100	3.46	86.5	3.46	86.5	0.89	96.7
30	6	100	6	100	3.428	85.7	3.428	85.7	1.06	115.2
60	6	100	6	100	3.428	85.7	3.428	85.7	1.06	115.2
90	6.65	110.8	6.65	110.8	5	125	5	125	1.11	120.6

: Consideramos como 100% el valor hallado en la cuajada bien exprimida.

III.6.b.3. Influencia del almacenamiento en congelación  
sobre las aflatoxinas presentes en queso Madurado

A la vista de los resultados reflejados en la tabla III.73, se puede concluir la estabilidad de las aflatoxinas investigadas tras 60 días de almacenamiento en congelación. A los 90 días, se producen unos hechos sorprendentes por la diferencia habida entre las distintas aflatoxinas: B<sub>1</sub> y M<sub>1</sub> sufren un ligero incremento, G<sub>2</sub> permanece estable mientras que G<sub>1</sub> muestra un elevado incremento, permaneciendo en valores absolutos al nivel de B<sub>1</sub>, pero llegando en valores relativos a un 200% de recuperación.



Tabla III.73 .- Influencia del almacenamiento en congelación sobre las aflatoxinas presentes en queso  
Maturado en el lote 2

AFLATOXINAS										
tiempo en días	R <sub>1</sub>		R <sub>2</sub>		G <sub>1</sub>		G <sub>2</sub>		M <sub>1</sub>	
	µg/kg	%	µg/kg	%	µg/kg	%	µg/kg	%	µg/kg	%
30	6	100	6	100	3.28	82	3.28	82	0.965	104.89
60	6	100	6	100	4	100	4	100	0.965	104.89
90	8	133	4.78	79.6	8	200	4	100	1.21	131.52

Consideramos como 100% el valor hallado en la cuajada bien exprimida

#### IV. DISCUSSION

#### IV.1. PERDIDA DE LA CAPACIDAD AFLATOXICOGENICA EN CEPAS TOXICAS

Ha sido descrita por diversos autores la pérdida de capacidad de síntesis de aflatoxinas por sucesivos pases de las cepas que poseen esta propiedad a través de medios sintéticos (29, 93, 383, Mayne et al. citado en 29); e incluso Torres et al. (citado en 29) mostraron la degeneración de 4 cepas aflatoxicogénicas después de pases consecutivos a intervalos de 72h sobre un medio natural como es el trigo machacado y humedecido.

Para Bennett et al. (29), esta pérdida de la capacidad de producción de aflatoxinas con mantenimiento de otras características puede ser interpretada como una evidencia de que la información genética para la síntesis de aflatoxinas es extracromosómica.

En las experiencias llevadas a cabo por Vanderhoven et al. (383) se procedió a sucesivas siembras de una serie de cepas: al cabo de un cierto número de pases, sólo una cepa conservaba la capacidad de síntesis de aflatoxinas. Parece poco probable que este proceso se produzca por una mutación genética, como ha sido sugerido por ciertos autores. El medio de cultivo tampoco parece directamente responsable de esta situación, por cuanto una cepa conservó su capacidad

aflatoxicogénica. Es probable que lo que suceda de pase en pase es que tenga lugar un proceso de selección de conidios, como ya indicaron Schroeder y Verret (322), en el sentido de que no todos los conidios de un mismo conidióforo dan origen a micelios con idéntico metabolismo. Con lo cual la pérdida ya sería irreversible, aun cuando se haga un pase a un medio natural.

Con objeto de evitar estas circunstancias, como hemos indicado dentro del Capítulo correspondiente de Material y Métodos, procedíamos a sembrar periódicamente nuestras cepas en un medio natural que soporta alta producción de aflatoxinas como es el medio de trigo machacado y humedecido, estableciendo conjuntamente controles por siembra en medio AFA, en el que se detecta fácilmente la capacidad aflatoxicogénica por la fluorescencia que toma el medio.

En el curso de nuestras investigaciones no detectamos en ningún caso pérdida de la capacidad aflatoxicogénica por parte de la cepa A. parasiticus NRRL 2999.

#### IV.2. TECNICAS DE DETERMINACION DE AFLATOXINAS EN LECHE Y PRODUCTOS LACTEOS

Los resultados encontrados por nosotros en la utilización de distintas técnicas analíticas coinciden en general con los mencionados por los propios autores que describieron dichas técnicas. Comentaremos en primer lugar estas metodologías para pasar a continuación a la técnica descrita por nosotros.

- Técnica de Lafont et al. (193):

En la descripción original de la técnica el autor no indica porcentaje de recuperación, y el hallado por nosotros, 93%, puede considerarse como bueno: da un coeficiente de variación de 6.18, inferior al encontrado por nosotros, que se sitúa en 9.

- Técnica de Tripet et al. (368):

Sus datos son coincidentes con los nuestros en cuanto al porcentaje de recuperación (92.8 y 92.1% respectivamente) y al rango de variación.

Estas 2 técnicas presentan un límite de detección muy bajo, de 5 ppt (0.005 µg/L); sin embargo, sus características de una excesiva lentitud, y gasto de material y reactivos hicieron desaconsejable su utilización en nuestros estudios.

- Técnica de Stubblefield (353):

Nuestros datos coinciden en general con los descritos por el autor, con una recuperación en torno al 80%; Esta técnica presenta las ventajas de rapidez, economía y sensibilidad, pero sin embargo su límite de detección de 0.1 µg/L no permite un análisis fiable de muestras con bajo grado de contaminación.

El hecho de que por unas u otras razones, ninguna de estas técnicas resultara de nuestra plena aceptación, nos hizo buscar una nueva técnica analítica para aflatoxinas.

- Técnicas I y II:

Los porcentajes de recuperación de estas técnicas en queso, inferiores al 90%, son seguramente debidos a la dificultad de obtener una perfecta homogeneización del queso con la solución de bicarbonato sódico.

Estas técnicas se muestran útiles no sólo para M<sub>1</sub>, sino también para otras aflatoxinas, así como para una gran variedad de productos lácteos.

La producción experimental de aflatoxinas en productos lácteos, especialmente en queso, ha sido ampliamente estudiada, como ha sido revisado recientemente por Tantaoui-Elaraki y Khabbazi (363); estos estudios se ven dificultados por la ausencia de un método analítico rápido para aflatoxinas. La Técnica II es perfectamente útil en estos casos, en que su límite de detección (0.1 ppb en leche

y yogur y 0.4 ppb en queso) se encuentra por debajo de las necesidades reales. Empleando esta técnica 6 muestras pueden ser extraídas en una hora y media.

La técnica descrita por nosotros no requiere la medida de volúmenes intermedios durante su desarrollo para poder cuantificar las aflatoxinas, cosa que sí es precisa en otras técnicas. La totalidad de las aflatoxinas de la muestra original estarán presentes en el extracto clorofórmico final.

En el curso de nuestros estudios, hallamos que las aflatoxinas se disolvían en la fase acuosa de los productos lácteos después de la alcalinización con bicarbonato sódico, mientras que la acidificación resultó en su precipitación con la caseína. Esto se demostró por la adición lenta de 1.5 ml de ácido acético a 50 ml de leche en agitación con la ayuda de un agitador magnético, seguido de centrifugación a 12000 rpm durante 10 minutos. El precipitado, que contenía virtualmente la totalidad de las aflatoxinas, fue solubilizado con una solución de bicarbonato sódico, y esta solución tratada con Metanol-Acetona (75-30) en la forma descrita para las Técnicas originales. Con este procedimiento la recuperación de aflatoxinas fue del 90%, con lo que esta variante puede ser útil para productos lácteos con un elevado contenido en grasa, ya que la mayoría de los lípidos son fácilmente eliminados.

En el desarrollo de la técnica, la adición de  $\text{CO}_3\text{HNa}$  es

esencial para prevenir la precipitación de la caseína antes de la extracción de las toxinas con Metanol-Acetona. La adición de esta mezcla cubre varios propósitos:

(a) La polaridad de la fase acuosa disminuye lo suficiente como para favorecer la solubilización de las aflatoxinas presentes.

(b) El bicarbonato es precipitado así sin disminuir el grado de solubilización de las aflatoxinas

(c) Se precipitan proteínas de la leche.

(d) Los lípidos no son solubilizados debido a la alta polaridad de la mezcla Metanol-Acetona-Agua, y por tanto, con la centrifugación a baja temperatura y alta velocidad se separan y solidifican, mientras que las aflatoxinas permanecen en solución.

Los lípidos después son fácilmente extraídos por filtración, proceso que debe ser llevado a cabo lo mas rápidamente posible, porque la grasa fundirá si se eleva la temperatura.

En resumen, la nueva técnica propuesta por nosotros presenta las siguientes ventajas:

(1) Es rápida, sensible y permite un alto porcentaje de recuperación de las aflatoxinas.

(2) Puede ser adaptada a diferentes necesidades: (i) técnica rápida con un límite de detección de 0.1 ppb en leche y yogur, y 0.4 ppb en queso (Técnica II), y (ii) técnica más larga con un límite de detección de 0.02 ppb en leche y yogur, y 0.05 ppb en queso (Técnica I).

(3) Es útil para diferentes productos lácteos.



(4) Es económica por cuanto los materiales usados tienen bajo coste en comparación con otros métodos analíticos.

(5) Aflatoxinas  $M_1$  ,  $B_1$  ,  $B_2$  ,  $G_1$  y  $G_2$  pueden ser extraídas y cuantificadas, lo que es particularmente importante para productos lácteos sólidos, susceptibles de ser contaminados con hongos aflatoxicogénicos.

Por tanto, a la vista de estas características, se propone la técnica I para estudios epidemiológicos de presencia de  $M_1$  en leche y productos lácteos, en que un bajo límite de detección es requerido. Mientras que la Técnica II sería adecuada para estudios de producción experimental de aflatoxinas en productos lácteos permitiendo una alta recuperación en un corto tiempo, y por consiguiente, el fácil procesamiento de un elevado número de muestras.

#### IV.3. DETERMINACION DE AFLATOXINAS EN MUESTRAS DE LECHE COMERCIAL

Para proceder a la realización del muestreo para determinar la incidencia que la contaminación por aflatoxina  $M_1$  podría tener en leches españolas, escogimos la provincia de León, y concretamente su zona Norte, por tener un clima húmedo, semejante al de la Europa Central, que podría dar lugar con mayor facilidad a la aparición de enmohecimiento en los alimentos para el ganado lechero, y consecuentemente, a la contaminación de la leche por aflatoxinas.

Las muestras de leche fueron recogidas a lo largo de un año con la finalidad de establecer la posibilidad de existencia de distribución estacional, lo que no se vió plenamente confirmado por nuestras experiencias, apareciendo el mayor número de muestras positivas en Primavera y Otoño. Es en Otoño e Invierno cuando la alimentación de los animales se ve suplementada con piensos compuestos, que a través de distintos componentes (fundamentalmente cacahuete y algodón) pueden vehicular la aflatoxina  $B_1$ , dando la consiguiente aparición de  $M_1$  en leche (34, 117, 118, 120, 140, 161, 171, 184, 261, 268, 273, 339, 410). A la vista de las experiencias de otros autores se puede considerar bajo el número de muestras positivas detectadas en Invierno.

Desde el punto de vista legislativo, no existen en nuestro país normas que regulen el contenido de aflatoxinas en productos para alimentación humana, si bien deben tenerse en cuenta las recomendaciones de FAO y OMS en el sentido de fijar el contenido máximo de aflatoxinas en alimentos para consumo humano en 30 ppb (64, 155).

Lo que sí está legislado es un límite de 20  $\mu\text{g/Kg}$  de aflatoxina  $B_1$  en alimentos para ganado lechero.

Esta cantidad, caso de ser ingerida por el ganado lechero, supondría un determinado nivel de  $M_1$  en leche, que estaría establecido siguiendo el criterio de varios autores entre los siguientes valores: 0.3 ppb (141), 0.05 ppb (262), 0.1-0.3 ppb (339), 0.02-0.2 ppb (379). Esta variabilidad es dependiente de los múltiples factores que pueden influir, de los que los más destacados son: cantidad de alimento ingerido, cantidad de leche producida y grado de conversión de  $B_1$  a  $M_1$ . En cualquier caso, a la vista de los bajos niveles de  $M_1$  detectados por nosotros en leche, se podría considerar inicialmente que el alimento de los animales productores de la leche analizada no superaba las normas legislativas en cuanto a su contenido en  $B_1$  (recordemos 20 ppb); pero ésto lo podríamos afirmar si se tratara de leche obtenida de granjas determinadas o de animales específicos; al tratarse de leche comercial, las aflatoxinas han sufrido un proceso de dilución, al mezclarse las leches contaminadas con otras no contaminadas, lo que hace pensar que la leche tóxica podría proceder de animales que han sido alimentados

con productos que sobrepasan esas 20 ppb que marca la legislación.

Refiriéndonos a la legislación de distintos países que regulan el contenido en  $M_1$  de la leche, y concretamente a Suiza, de todas nuestras muestras positivas, solo 2, correspondientes a los meses de Noviembre y Diciembre, sobrepasan el límite de 0.05 ppb para leche comercial. En este sentido debemos indicar que Suiza es uno de los países con normativas más estrictas en cuanto a las aflatoxinas (91).

Si tomamos como referencia la ley de otros países como Holanda o Estados Unidos (377), nuestras muestras se encuentran dentro de sus márgenes legales, que están establecidos en 0.1 ppb y 0.5 ppb respectivamente.

Por supuesto, las leches positivas quedarían fuera de toda normativa en aquellos países que cuentan con un nivel cero de tolerancia para aflatoxinas en leche, como son Japón, Malasia, Polonia y Dinamarca (37).

En la tabla 1.2, dentro del capítulo de Introducción, podemos comparar nuestros resultados con los obtenidos por otros autores en diferentes países. Aquí nos referiremos únicamente a los 2 seguimientos anteriores que se han llevado a cabo en nuestro país, los de Jodral (161, 164) y Burdaspal et al. (60).

Jodral (161, 164) no detecta contaminación alguna por  $M_1$  en

330 muestras de leche esterilizada comercial, y sí en muestras de leche cruda recogidas en distintas granjas de Andalucía; respecto a estas últimas los resultados obtenidos son semejantes, aunque con un porcentaje un poco inferior al nuestro, apareciendo muestras positivas únicamente en Invierno y Primavera. Estas diferencias pueden venir determinadas por el distinto clima existente en Andalucía y la zona Norte de España.

Burdaspal et al. (60) describen un porcentaje de contaminación por  $M_1$  en leches comerciales, en torno al 7.3%, con unos niveles de contaminación muy moderados, semejantes a los nuestros, y situándose entre 0.02 - 0.04 ppb. Los autores atribuyen este moderado nivel a la baja contaminación del alimento del ganado, mientras que como ya hemos indicado, para nosotros se trata más bien del efecto de dilución que sufren las leches contaminadas al mezclarse con otras no contaminadas de diferentes orígenes, en la Central Lechera.

#### IV.4. PRODUCCION DE AFLATOXINAS SOBRE YOGUR

##### IV.4.a. Yogur como sustrato para producción de aflatoxinas

Con los resultados obtenidos por nosotros queda plenamente demostrado que el yogur es un buen sustrato para la producción de aflatoxinas. Esto viene determinado por las características que presenta el yogur, fundamentalmente en lo que se refiere a pH y factores nutritivos. En lo que respecta al pH, el yogur presenta un valor aproximado de 4.4, que ha sido descrito como óptimo para producción de aflatoxinas por distintos autores (165, 199, 219, 291, 363). Por otra parte, con respecto a los factores nutritivos, la composición aproximada del yogur es la siguiente (169):

Prótidos.....	2.5-3.9%
Lactosa.....	2.4-4.1%
Lípidos.....	2.8-4.5%
Sustancias minerales...	0.7-0.8%
Acido láctico.....	0.8-1.2%

El nivel de aflatoxinas producido sobre un medio nutritivo se muestra relacionado fundamentalmente con el contenido en carbohidratos, siendo también importante el nivel de prótidos (1). A este respecto, por una parte ciertos autores han indicado que cantidades de aflatoxinas muy bajas o nulas

fueron producidas por Aspergillus cuando la lactosa actúa como única fuente de carbono (55, 331), e incluso Abdollahi (1) señaló que concretamente la cepa A. parasiticus NRRL 2999 perdía el enzima o actividad de transporte necesaria para la síntesis de aflatoxinas en estas condiciones. A pesar de esto, se ha descrito que la lactosa permite la producción de una considerable cantidad de aflatoxinas (24). Nuestros resultados también se ven apoyados por el hecho de que la leche ha sido utilizada por distintos autores como medio de cultivo para la producción de aflatoxinas (24, 154, 166, 362).

Tampoco podemos olvidar el posible papel a desempeñar por las bacterias lácticas. Se ha descrito que algunas de estas bacterias, concretamente Streptococcus lactis y Lactobacillus casei, si bien no afectan el crecimiento del hongo, sí disminuyen la capacidad de producción de aflatoxinas (76, 101, 103). Incluso se ha sugerido que S. lactis es capaz de secretar un compuesto inhibitorio de dicha síntesis (76). Sin embargo, Wiseman y Marth (398) no detectaron este efecto inhibitorio.

En la bibliografía consultada aparece descrita la producción de aflatoxinas en yogur en un trabajo de Park y Bullerman (255), en que estudiando la producción de aflatoxinas a distintas temperaturas incluyen entre los substratos utilizados el yogur. Este es un producto comercial que se transfiere a contenedores estériles cubiertos e inoculados

con una suspensión de esporas. Describen la producción de aflatoxinas en los niveles que a continuación indicamos:

A. parasiticus a 15°C: en 10 días nula, y en 21 días 0.9 µg/g.

A. flavus a 15°C: en 10 días 2.6 µg/g, y en 21 días 158 µg/g.

A. parasiticus a 25°C: en 10 días 1.3 µg/g, y en 21 días 1.2 µg/g.

A. flavus a 25°C: en 10 días 101 µg/g, y en 21 días 138 µg/g.

A 5°C describen la producción de cantidades traza de aflatoxinas en yogur; es posible que estas aflatoxinas procedieran de las propias esporas del inóculo.

Comparando estos resultados con los nuestros en yogur comercial con incubación en envase intacto a 28°C para A. parasiticus los valores son muy inferiores a los hallados por nosotros, mientras que para A. flavus serían más o menos equiparables. En cambio, a 15°C los resultados son equiparables en A. parasiticus pero muy superiores en A. flavus.

Nosotros describimos que el crecimiento fúngico se ve acompañado de producción de aflatoxinas, conjuntamente con la aparición en el sustrato de una pigmentación amarillenta, tanto más intensa cuanto mayor es dicha producción de aflatoxinas. Dicha pigmentación se acompaña de fluorescencia



cuando es apreciada bajo luz ultravioleta de 366nm. Esta pigmentación ha sido descrita en otros productos lácteos, concretamente en queso, en que al igual que sucede en yogur, profundiza hacia el interior (167, 408). Esta misma pigmentación ha sido descrita cuando se produce el crecimiento de cepas aflatoxicogénicas sobre medios sintéticos (75, 138) y sobre granos vegetales (72, 317). Asimismo, se ha señalado que esta pigmentación pasa al extracto clorofórmico, y la intensidad de la misma va relacionada con el nivel de aflatoxinas posteriormente detectado (319).

De nuestros resultados queremos destacar fundamentalmente el hecho de que en algunos casos fueron detectadas aflatoxinas sin alteración aparente del yogur, con el consiguiente peligro que ello puede acarrear para el consumidor. Esto sucedió en los casos que indicamos a continuación, en los que se hace referencia a las aflatoxinas totales detectadas en micelio + 50g sustrato:

•Yogur comercial en envase dañado incubado a 28°C durante 48h.- 0.78 µg aflatoxina total/50g

•Yogur comercial en envase intacto incubado a 28°C durante 7 días.- 0.365 µg aflatoxina total/50g.

•Yogur comercial en envase dañado incubado a 15°C:

10 días.- 0.076 µg aflatoxina total/50g.

11 días.- 0.142 " " " " .

•Yogur comercial en envase intacto incubado a 15°C:

17 días.- 0.137 µg aflatoxina total/50g.

20 días.- 0.578 " " " " .

•Yogur elaborado por nosotros destapado e incubado en envase intacto a 28°C:

15 días.- 0.705 µg aflatoxina total/50g.

20 días.- 7.89 " " " " .

•Yogur elaborado por nosotros destapado e incubado en envase intacto a 15°C:

18 días.- 0.08 µg aflatoxina total/50g.

20 días.- 0.188 " " " " .

Como se puede comprobar, en la mayor parte de los casos el nivel de aflatoxinas detectado es mínimo, y por tanto no se alcanzaría en ningún caso el grado de ingestión diaria de 10 µg de aflatoxinas, cifra considerada como inductora de la producción de tumores (198). Esto presenta una excepción, en el yogur elaborado por nosotros destapado e incubado en envase intacto a 28°C durante 20 días, en que se llegaron a detectar 7.89 µg/50g; esta cifra sí puede considerarse peligrosa para el consumidor.

En aquellos casos con alteración evidente del yogur, alertaría al consumidor de los riesgos que su ingestión conllevaría, sobre todo cuando se ha producido la esporulación, lo que permitiría el reconocimiento del crecimiento típico de A.flavus (256). A este respecto queremos hacer mención a modernas técnicas de elaboración de yogur, en que es producido en grandes tanques de fermentación

continúa; si en el interior de estos grandes contenedores se produjese contaminación por una cepa aflatoxicogénica, que pudiera desarrollarse y dar lugar a la producción de aflatoxinas, su crecimiento no se haría evidente al proceder al envasado del producto.

#### IV.4.b. Influencia del proceso de elaboración del yogur sobre la producción de aflatoxinas

Comparamos los resultados obtenidos en yogur elaborado por nosotros y yogur comercial cuando se incuban a 28 y 15°C, con objeto de establecer la posible incidencia que el proceso de elaboración del yogur pudiera tener sobre el desarrollo de la cepa aflatoxicogénica y la consiguiente producción de aflatoxinas.

A 28°C el desarrollo miceliar se va produciendo de forma más rápida en el yogur elaborado por nosotros que en el comercial: esto en un principio podría ser achacado a que durante el periodo de elaboración del yogur a 45°C ya se inicia el crecimiento del hongo, pero el hecho de que en el yogur control elaborado por nosotros e inoculado una vez finalizado su proceso de elaboración, el desarrollo miceliar sea muy superior al descrito en yogur comercial, nos inclina más bien a pensar en la posible influencia que pudieran tener distintos conservantes añadidos al yogur comercial, que frenarían ligeramente el desarrollo fúngico.

A 15°C en cambio sucede lo contrario, es decir, más rápido crecimiento se produce en yogur comercial, si bien los valores son más parejos entre éste y el elaborado por nosotros que en el caso anterior. Esto podría venir determinado por el hecho de que la temperatura es un factor más limitante que el sustrato, que no adquiriría la importancia que alcanza cuando se mantiene a 28°C. En cambio, se ha descrito que el efecto del sustrato sobre el nivel de toxina disminuye conforme se incrementa la temperatura (320).

En cuanto a las aflatoxinas detectadas en micelio, tanto a 28 como a 15°C, más altos valores se encontraron en el yogur elaborado por nosotros, hasta que llega un punto del periodo de incubación en que estos valores se estabilizan o se inclinan hacia el yogur comercial. Esto mismo sucede en las aflatoxinas detectadas en el sustrato a 15°C, mientras que a 28°C los valores en aflatoxinas son bastante parejos en yogur comercial y en el elaborado por nosotros.

#### IV.4.c. Influencia del sustrato (yogur comercial o yogur elaborado por nosotros)

Dicha influencia fue determinada por la comparación de los resultados obtenidos sobre yogur comercial y sobre yogur elaborado por nosotros inoculado una vez finalizado su proceso de elaboración.

A 28°C el crecimiento fúngico es ligeramente más intenso en el yogur elaborado por nosotros. En cambio, la producción de aflatoxinas sobre el sustrato, así como la detectada en micelio, es superior en el yogur comercial. Esto podría estar relacionado con el contenido en conservantes del yogur comercial, que si bien podrían afectar el crecimiento fúngico, no tendrían este efecto sobre la capacidad de producción de aflatoxinas.

A 15°C se obtienen resultados contradictorios con los descritos a 28°C, por cuanto si bien el desarrollo micelial es superior en el yogur comercial, las aflatoxinas detectadas en sustrato y micelio son superiores en el yogur elaborado por nosotros. Esto podría estar relacionado con el hecho de que la temperatura actúa como un factor limitante más importante que el tipo de sustrato de que se trate, no teniendo a esa temperatura tanta acción los posibles conservantes añadidos al yogur comercial, que por tanto, no originan disminución del crecimiento micelial.

#### IV.4.d. Influencia de las condiciones de elaboración del yogur (tapado o destapado)

En las Plantas elaboradoras de yogur a nivel industrial suele procederse al sellado del envase una vez añadidos todos los ingredientes, y antes de que tenga lugar la fermentación para

dar lugar al producto final. En cambio, el proceso de elaboración casera se efectúa con el envase destapado.

Desde este punto de vista hemos comprobado la práctica ausencia de crecimiento fúngico y la total ausencia de producción de aflatoxinas cuando dicho proceso de elaboración se efectúa en envase perfectamente cerrado, aun cuando se lleve a incubación a 28°C durante 25 días.

En cambio, aun cuando la incubación se efectúe en envase cerrado, si la elaboración se ha producido en envase destapado, sí tiene lugar un crecimiento que se traduce en producción de aflatoxinas (7.89 µg aflatoxina total/50g a los 20 días a 28°C, y 0.188 a 15°C).

Esto parece indicar que en el tiempo de incubación a 45°C, o bien durante su enfriamiento, se producen las condiciones necesarias para iniciar el desarrollo fúngico, suficiente para traducirse en la síntesis de pequeñas cantidades de aflatoxinas. Por contra, como hemos visto anteriormente, cuando se producen altos niveles su influencia es prácticamente nula.

La temperatura máxima para la producción de aflatoxinas se ve afectada por distintos factores, como humedad, concentración de Oxígeno, nutrientes (129), aun cuando la mayor parte de los autores se muestran de acuerdo en afirmar que la temperatura máxima de producción de aflatoxinas es en cualquier caso inferior a 45°C (94, 145, 165, 245, 295, 319). En determinados casos sí se ha descrito capacidad de crecimiento y producción de aflatoxinas a 45°C (3, 335, 336). De esto se deduciría que el tiempo de incubación a 45°C

parece ser poco importante y adquiriría mayor importancia el periodo de enfriamiento desde esa temperatura de 45°C hasta temperaturas de refrigeración.

IV.4.e. Influencia de las condiciones de incubación (en envase intacto o dañado)

Tanto a 15 y 28°C por una parte, como en yogur comercial o elaborado por nosotros por otra, el crecimiento micelial y las aflatoxinas detectadas en micelio y sustrato son muy superiores cuando la incubación se efectúa en envase intacto en relación a cuando se hace en envase dañado. Esto consideramos se encuentra relacionado con las condiciones de incubación en aerobiosis en un caso y en microaerofilia en otro.

Se ha descrito que una baja concentración de Oxígeno deprime el crecimiento fúngico y la producción de aflatoxinas (59, 129), si bien Aspergillus es capaz de desarrollarse con muy bajos niveles de Oxígeno, aunque por supuesto de una forma mucho más lenta (75). Por otra parte, Shih y Marth (335), y en contradicción con nuestros resultados, indican que las condiciones bordeando la anaerobiosis favorecen la síntesis de aflatoxinas. Para estos autores, esto podría ayudar a explicar por qué el máximo nivel de aflatoxinas se produce en un medio con una alta concentración de glucosa toda vez que el hongo probablemente desarrolle un modo menos aeróbico de

metabolismo en respuesta al exceso de glucosa.

#### IV.4.f. Influencia de la temperatura

En ninguna de las diferentes experiencias efectuadas por nosotros se llegó a detectar producción de aflatoxinas en yogur a 10°C ni tan siquiera indicios de crecimiento. Con proceso de elaboración destapado, e incubación previa 24h a 28°C antes de ser llevado a 10°C, tampoco pudo determinarse crecimiento o producción de aflatoxinas. Esto indica que esta temperatura es completamente desfavorable a la producción de aflatoxinas en yogur. Por tanto, siempre que se mantenga la temperatura de refrigeración para almacenar el yogur, se prevendrá el crecimiento de cepas aflatoxicogénicas y la consiguiente producción de aflatoxinas.

Si bien en la literatura se ha llegado a describir la producción de aflatoxinas a 7.5°C en medios sintéticos, sobre productos lácteos se han descrito resultados fiables a partir de 13°C, y nunca a temperaturas inferiores (55, 167, 174, 179, 200, 250, 299, 330, 408). En arroz se describió la producción de aflatoxinas a 10°C en un nivel de 6 µg/g en 56 días (57). Se ha indicado la producción de cantidades traza a 7.5 y 10°C sobre medios sintéticos (381). Schindler (318) describió la producción de aflatoxinas sobre medio sintético a 7.5°C, y Northolt et al. (248) a 10°C.

Asimismo, como era lógico esperar, en todos los casos a 28°C



se detectaron mayores niveles de aflatoxinas que a 15°C, siempre y cuando el resto de las condiciones fueran similares y variara únicamente la temperatura. Debemos tener en cuenta que 28°C se encuentra dentro del margen de 25-30°C que es considerado óptimo para producción de aflatoxinas (3, 56, 59, 87, 94, 145, 165, 219, 245, 295, 319, 320, 341).

#### IV.4.g. Variaciones a lo largo del periodo de incubación

Tanto el grado de desarrollo fúngico, medido en forma de peso de micelio seco, como el nivel de aflatoxinas detectado tanto en micelio como en sustrato, no siempre van incrementándose progresivamente a lo largo del periodo de incubación, sino que sufren una serie de oscilaciones. Así, en yogur comercial en envase dañado e incubado a 28°C, el peso de micelio seco sufre una disminución al 4º día, lo que sucede a las aflatoxinas presentes en micelio en los días 4º, 8º y 15º, y en sustrato en el 8º. En yogur comercial en envase dañado incubado a 15°C disminuyen las aflatoxinas en sustrato al día 17. En yogur elaborado por nosotros destapado e incubado en envase dañado a 28°C, tanto peso de micelio seco como aflatoxinas en micelio y sustrato disminuyen al 8º día.

Este fenómeno observado en la cepa A. parasiticus 2999 fue asimismo descrito en A. flavus 3251, con disminución de las aflatoxinas en micelio en el día 10 y en sustrato en el día 8.

Estos procesos de disminución los encontramos relacionados

con el crecimiento fúngico y fundamentalmente con la esporulación que se va produciendo, dando lugar a la producción de nuevas generaciones de células fúngicas, con la consiguiente influencia que esto desarrolla sobre la producción de aflatoxinas. Se ha descrito que la producción máxima de aflatoxinas coincide con la esporulación masiva, y a su vez con la desaparición casi total de los glúcidos (288).

Consideramos que en aquellos casos en que no se llegaron a apreciar estas oscilaciones fue porque no se había alcanzado un cierto nivel de crecimiento; si se dejara incubar más tiempo, se producirían esas oscilaciones, tanto en peso micelio seco como en aflatoxinas detectadas. Si bien se ha descrito que la aparición de micelio abundante e incluso esporulación no garantizan la aparición de aflatoxinas (207), como hemos descrito nosotros en general el hecho de que se produzca crecimiento miceliar tiene el mismo sentido que decir producción de aflatoxinas (179, 199, 250). Si bien en general el nivel de aflatoxinas producido va paralelo al desarrollo miceliar (275), esto no siempre es así, produciéndose oscilaciones (229, 241, 319), que dan lugar a curvas de producción de aflatoxinas de tipo monofásico o bifásico (327, 334) dependiendo de las condiciones de cultivo, medio de que se trate y tamaño del inóculo. En general, en condiciones óptimas, se alcanza el máximo nivel de aflatoxinas a los 5-10 días, para disminuir después.

Al igual que sucede en los resultados descritos por nosotros, la producción de aflatoxinas se inicia durante el desarrollo miceliar antes de que la esporulación sea evidente (381).

De acuerdo con Moss (241) debemos tener en cuenta que parte del micelio puede alcanzar el "status" fisiológico de fase estacionaria, sintetizando y excretando las micotoxinas, mientras que otras partes del mismo micelio crecen de forma activa colonizando substrato fresco.

La disminución de aflatoxinas sobre un substrato viene determinada por el agotamiento de los nutrientes y la subsiguiente utilización de las aflatoxinas por el hongo (148). Estos autores postulan que dicha degradación también tendría lugar en el micelio joven, lo que ocurre es que en este caso la síntesis es muy superior a la degradación; cuando el micelio envejece, la síntesis disminuye y la degradación se incrementa, habiendo una reducción de los niveles de aflatoxinas.

Para Diegler y Lillehoj (72) un proceso de lisis miceliar seguido de degradación extramiceliar podría ser responsable del declive en los niveles de aflatoxinas.

#### IV.4.h. Porcentaje de aflatoxinas B:G producidas

Aunque resulta difícil generalizar, debido a la diversidad de experiencias realizadas, se puede decir que a 28°C, tanto en micelio como en substrato, y tanto en yogur comercial como en

elaborado por nosotros, la proporción B:G se encuentra próxima a 1:1.

En cambio, a 15°C se produjo una mayor alternancia de resultados, siendo en la mayor parte de los casos favorable a G.

Esto se muestra de acuerdo con lo descrito por distintos autores sobre diversos sustratos y en distintas cepas en el sentido de que con el incremento de temperatura aumenta la proporción de aflatoxina B con respecto a G (57, 72, 93, 129, 134, 203, 256, 320). Es decir, la aflatoxina B predomina a elevadas temperaturas y la G a bajas.

Se ha descrito asimismo una posible influencia del pH, en el sentido de que un pH ácido como el del yogur favorecería la síntesis de aflatoxina B sobre la G (47); esto explicaría por qué el predominio de aflatoxina G no es excesivo, a diferencia de lo descrito por ciertos autores en otros sustratos (154, 255).

#### IV.4.1. Distribución de aflatoxinas en micelio/sustrato

En primer lugar debemos señalar que consideramos como más representativa la forma de indicar los resultados en forma de micelio total/50g sustrato, que refleja mejor las distintas oscilaciones que va sufriendo la producción de aflatoxinas.

Cuando el resultado se expresa gramo a gramo, los valores son

siempre muy superiores en el micelio, como ya expresaron otros autores sobre distintos substratos (136, 198, 408). En cambio, cuando, al igual que hace Bullerman (56), el resultado se expresa en  $\mu\text{g}/50\text{ml}$  medio y en  $\mu\text{g}/\text{micelio}$  total, distintas alternancias son apreciadas.

Tanto a 28 como a 15°C los valores se mostraron próximos a 1:1 a lo largo del periodo de incubación, aun cuando a 15°C, al principio del desarrollo, se encontraron claras inclinaciones hacia el micelio o hacia el substrato, dependiendo de la experiencia que se tratara.

En principio sería lógico pensar que cuando las aflatoxinas son detectadas por primera vez, debían aparecer fundamentalmente en el micelio (179), pero en nuestras experiencias esto no sucede así en todos los casos; por ejemplo, en yogur comercial y en elaborado por nosotros incubados a 15°C, fueron detectados valores mucho más elevados de aflatoxinas en substrato que en micelio en el inicio de la producción de aflatoxinas. Ya Shih y Marth (336) describieron que al final de la incubación se detecta mayor porcentaje de aflatoxinas en el micelio con respecto al substrato.

A partir de los resultados obtenidos por nosotros no podemos deducir conclusiones sobre la influencia que la temperatura podría tener sobre el reparto de aflatoxinas en micelio/substrato, si bien en la literatura se han descrito ideas contradictorias. Así, por una parte se ha descrito que

el incremento de la temperatura favorece el acúmulo de aflatoxinas en el micelio (203), mientras que por otra se afirma que este incremento de temperatura favorece la difusión de aflatoxinas desde el micelio (Schroeder y Ashworth citado en 333).

#### IV.4.j. Influencia de la cepa aflatoxicogénica

Se efectuaron estudios con la cepa A.flavus 3251 para comprobar que los resultados obtenidos con la 2999 no se limitaban a una característica individual, sino que era compartida por el resto de cepas aflatoxicogénicas.

En cuanto al crecimiento miceliar, aunque se inicia de forma conjunta en ambas cepas, inicialmente es más rápido en la 2999, para posteriormente estabilizarse y adquirir valores similares en ambas.

En cambio, el nivel de aflatoxinas tanto en micelio como en sustrato, presenta valores comparables en el 5<sup>º</sup> día, a partir del cual la cepa 2999 continúa aumentando la producción mientras que en la 3251 se estabiliza e incluso disminuye el nivel de aflatoxinas detectado.

#### IV.4.k. Influencia del tamaño del inóculo

El peso de micelio seco se incrementa con el tamaño del

inóculo. No sucede lo mismo con el nivel de aflatoxinas detectado en micelio y substrato, en que se mostró una clara disminución en el tamaño de inóculo mayor, el de  $4 \times 10^6$ .

Estos resultados se muestran parcialmente de acuerdo con lo descrito por ciertos autores en el sentido de que suspensiones débiles de esporas son más favorables a la toxicogénesis que las suspensiones densas (75, 362, Yousef y Marth citado en 369). Esto es explicado por Sharma et al. (327) en el sentido de que una disminución del tamaño del inóculo se traduce en un incremento en la duración de la fase logarítmica de crecimiento, y por consiguiente en un incremento gradual de la producción de aflatoxinas. A pesar de esto, llega un momento del periodo de incubación en que el nivel residual de aflatoxinas es similar en todos los tamaños de inóculo investigados, lo que indica que la mayor producción de toxina por parte de alguno de ellos, va después acompañado por una degradación más rápida.

En cambio, para Burzynska (63) la cantidad de aflatoxina producida es relativamente independiente del número de conidios inoculados.

#### IV.5 INFLUENCIA DEL PROCESO DE ELABORACION DEL YOGUR SOBRE LA AFLATOXINA M<sub>1</sub>

A la vista de los resultados descritos se puede concluir que la aflatoxina M<sub>1</sub> es estable durante el proceso de elaboración del yogur, así como durante su posterior almacenamiento en refrigeración.

Las pequeñas oscilaciones apreciadas son achacables a la técnica analítica empleada. El único resultado que puede ser considerado fuera de lo normal es el obtenido tras 7h de incubación a 45°C, en que se recuperó un 120% de aflatoxina M<sub>1</sub>.

Estos resultados se muestran de acuerdo con la hipótesis de que el procesado del yogur no afecta a su contenido en aflatoxina M<sub>1</sub> (346, 351, 377).

Van Egmond et al. (379) describieron un ligero enriquecimiento en M<sub>1</sub> del yogur con respecto a la leche original, que imputaron a una recuperación más completa por parte de la técnica analítica utilizada. Asimismo, describen la estabilidad durante el almacenamiento a lo largo de 7 días a 7°C.

Wiseman y Marth (399) describieron la estabilidad de M<sub>1</sub> durante el almacenamiento del yogur hasta 6 semanas, con ligeras oscilaciones, que fueron atribuidas a que el pH puede afectar a la estructura proteica y por tanto posiblemente



influye la capacidad del cloroformo para extraer  $M_1$  de la caseína. En estas experiencias no se describió el ligero enriquecimiento del yogur con respecto a la leche original, como habían indicado Van Egmond et al. (379).

Freymy y Chu (119) también indicaron esta estabilidad durante el proceso de elaboración del yogur.

Esta misma estabilidad se ha descrito durante la elaboración de otros productos lácteos fermentados, como el kefir y el suero de mantequería fermentado (10, 399).

Como resultado contradictorio con los anteriores se encuentran las experiencias de Megalla y Hafez (231), en que durante el proceso de elaboración del yogur describen la degradación de hasta 800 ppb de aflatoxina  $B_1$ , lo que fue determinado por análisis cromatográfico y comprobado por test de toxicidad en pollos. El autor define este hecho como debido a que la acidez es responsable de la transformación de  $B_1$  a  $B_{2a}$  en un proceso no enzimático. No encontramos explicación a este fenómeno apreciado en la estabilidad de la aflatoxina  $B_1$  en relación a lo descrito para la  $M_1$ , por cuanto si  $B_1$  se transforma en  $B_{2a}$ , igualmente  $M_1$  debería ser transformada en  $M_{2a}$ .

#### IV.6. PRODUCCION DE AFLATOXINAS EN QUESO MADURADO

##### IV.6.a. Proceso de elaboración del queso Madurado

La denominación dada por nosotros de queso Madurado hace referencia al tipo de queso que hasta hace poco tiempo era conocido en nuestro país como queso tipo Manchego, es decir, quesos similares en su proceso de elaboración y maduración pero que por una u otra razón no eran propiamente Manchegos. Esta denominación se encuentra prohibida en la actualidad, por cuanto el queso Manchego se encuentra protegido por la Ley de Denominación de Origen según Orden de 21 de Diciembre de 1984 aparecida en el Boletín Oficial del Estado número 5 de 5 de Enero de 1985.

Segun esta ley (35), en su artículo 2º, queda prohibida en otros quesos o productos lácteos, la utilización de nombres, marcas, términos, expresiones y signos que por su similitud fonética o gráfica con el nombre Manchego puedan inducir a confusión, aún en el caso de que vayan precedidos por los términos "tipo", "gusto", "estilo", "elaborado en", "madurado en", u otros análogos.

En su artículo 4º indica la zona de producción de leche apta para la elaboración del queso Manchego, y que está constituida por distintos términos Municipales de la Región de La Mancha, hasta un total de 321 términos, especificando en el artículo 5º que la leche será exclusivamente de oveja

de raza Manchega.

La leche utilizada por nosotros no procedía de La Mancha, y como ya indicamos en el apartado correspondiente, era una leche de mezcla de oveja, cabra y vaca.

En su artículo 8º especifica la zona de elaboración y maduración de este producto, que coincide con la zona de producción de leche y algunos términos municipales colindantes (otros 75).

En nuestras experiencias, el queso fue elaborado y madurado en nuestro propio laboratorio para poder controlar mejor las distintas variables que podrían influir en la producción de aflatoxinas.

En el Artículo 10º indica el proceso de elaboración seguido, que en esencia es el mismo que seguimos nosotros, y que ha sido descrito dentro del capítulo correspondiente de Material y Métodos.

Los objetivos que persigue esta Ley de Denominación de Origen del queso Manchego son fundamentalmente (108):

- Defensa y vigilancia de la denominación de origen, así como el fomento y control de la calidad de la leche y de los quesos.
- Definición de la zona de producción, elaboración y maduración.
- Fomento de la mejora de las explotaciones ganaderas.

Respecto al proceso de elaboración, indicaremos que junto a los quesos que serían utilizados en nuestras experiencias, se procedió a la elaboración de quesos Control dentro de cada lote; estos quesos, una vez cumplido su periodo de maduración, presentaban las características organolépticas típicas del queso Madurado. Por otra parte, indicar que los quesos no parafinados presentaban al final del madurado un aspecto más seco, más duro, que los parafinados.

#### IV.6.b. Distribución de esporas fúngicas en suero y cuajada

Dentro de los resultados obtenidos en la distribución de esporas presentes en leche original cuando con ésta se elabora queso, sorprenden las elevadas pérdidas con respecto a las esporas incorporadas a la leche, del 34% en uno de los lotes elaborados, y que llegan al 72% en el otro. Parece poco probable atribuir estas pérdidas a la destrucción de las esporas, y quizá es más aconsejado pensar en un proceso de agregación de las mismas, de forma que 3 ó 4 esporas dan lugar a una única colonia, y por tanto sean consideradas como una única unidad formadora de colonias en el método de recuento por dilución empleado por nosotros.

No disponemos de datos de otros autores que hayan efectuado estudios similares en otros tipos de quesos; únicamente

tenemos referencias de lo que ocurre con bacterias incluidas dentro del género Staphylococcus. En estudios efectuados en queso tipo Manchego (131) acerca de la distribución de células de Staphylococcus aureus durante su proceso de elaboración, se describió una presencia de estas células en suero en valores muy variables, entre el 5 y el 50 % del total según la cepa estudiada. Read y Bradshaw (290) observaron que en la cuajada se recuperaban el 92% de los estafilococos añadidos. Estos datos, sin embargo, consideramos no son extrapolables a lo que sucede en nuestras experiencias con las esporas fúngicas, por cuanto debemos tener en cuenta que en las bacterias no suele ocurrir ese fenómeno de agregación común en las esporas. Además, debido a su mayor capacidad de división, las células bacterianas están multiplicándose durante el proceso de elaboración del queso.

#### IV.6.c. Producción experimental de aflatoxinas en queso Madurado

Sobre queso Madurado entero, durante su periodo normal de madurado a 15°C, únicamente se detectó producción de aflatoxinas en queso no parafinado y que había sido salado en salmuera estéril con objeto de reducir lo más posible la presencia de hongos contaminantes pertenecientes al Género Penicillium (Q3 y Q4). Los niveles de aflatoxinas detectados

son muy bajos (0.4 a 0.7  $\mu\text{g}$  de aflatoxina total / g de queso), y están circunscritos a la capa más externa.

También se detectaron aflatoxinas en un queso limpiado y parafinado no salado en salmuera estéril, pero que fue mantenido únicamente durante 30 días en maduración, periodo al cabo del cual se llevó a cabo la toma de muestras. El nivel de aflatoxinas detectado fue de 0.005 a 0.01  $\mu\text{g/g}$ .

Cuando el queso es almacenado a temperaturas más altas (28°C),

favorables al desarrollo de Aspergillus parasiticus, los niveles de aflatoxinas producidas son superiores, profundizando hasta una segunda capa de 10 mm, con el consiguiente peligro que esto podría conllevar para el consumidor, que aún eliminando una gruesa capa de corteza se vería expuesto al consumo de estas toxinas. En la capa superficial se consiguen niveles de 1.13 a 4.13  $\mu\text{g/g}$  de aflatoxina total, y en la segunda capa de 10 mm de 0.0068 a 0.03  $\mu\text{g/g}$ . Siguiendo las reflexiones de Lie y Marth (198), que indican que 10  $\mu\text{g}$  es la dosis cancerígena diaria, bastaría un consumo de poco más de 2 g de la capa superficial para alcanzar ese nivel, mientras que en la segunda capa de 10 mm se precisaría un consumo superior a 300 g.

Sobre porciones de queso el desarrollo fúngico es más intenso, al igual que es mayor la cantidad de aflatoxinas que profundiza, lo que da idea de las precauciones que debe tomar el consumidor sobre el almacenamiento del queso una vez que éste ha sido cortado. Los valores máximos detectados a 28°C

fueron:

•13 días.- 131.9 µg/g aflatoxina total

•20 días.- 136.8 µg/g aflatoxina total (sumando los valores de las porciones T7-A y T7-B).

A 15 °C los valores máximos obtenidos fueron 0.0119 a 0.211 µg/g.

En cuanto al queso triturado, a 28°C se obtuvieron 86.9 (8 días) y 158.28 (11 días) µg/g.

En pasta de queso, a 28 °C valor máximo de 4.37 µg/g en sustrato y 9.8 en micelio. A 15°C, valor máximo de 0.28 en sustrato y 2.61 en micelio.

A 10 ° C, si bien se produce crecimiento visible de A.parasiticus , no da lugar a la producción de aflatoxinas.

En la Tabla IV.1 se puede apreciar un listado de los quesos sobre los que ha sido descrita la producción experimental de aflatoxinas, indicando las condiciones en que el estudio fue llevado a cabo, los autores, y el nivel máximo de toxinas detectado, que podemos comparar con los resultados obtenidos por nosotros. Existe una gran variación entre los datos ofrecidos, dependiendo fundamentalmente del tipo de queso, condiciones de temperatura a que se efectuó el estudio, días de incubación y cepa inoculada.

Los mayores niveles de aflatoxinas detectados por nosotros se

Tabla IV.1 .- Producción experimental de aflatoxinas sobre distintos tipos de queso

Tipo de queso	Características de incubación	Contenido máximo afl. total en µg/g	Profundización aflatoxinas	Autores
Cheddar	Superficie cortada Tª ambiente Elevada humedad 1 y 7 semanas	31.2	12.8 mm	Lie y Marth, 1967
Sin especificar	No esterilizado	0.05	-	Wildman et al., 1967
Tilsit	Porciones 30°C 6 días	0.8	10 mm	Frank, 1968
Romanian	Entero	-	-	Mihai et al., 1970
Tilsit Emmental	20-30 °C 20 días	0.4	-	Röthenbuhler y Bachmann, 1970
Tilsit	Porciones 16-30 °C HR 99%	10	12 mm	Kiermeier y Groll, 1970
Cheddar	Porciones 25°C 12 días	0.013	-	Oldham et al., 1971
Brick	Porciones 12.8-23.9 °C 1-14 semanas	0.1875	40 mm	Shih y Marth, 1972
Manchego	Pasta 30°C 12 días	0.515	-	Sanz et al., 1973
Tilsit Emmental	25°C 98% HR	-	-	Kiermeier y Rumpf, 1975
Boursin	Entero	26		
Camembert	Porción sin corteza	5.2		
Coulommiers	" " "	39		
Queso de cabra	" " "	331		
Pont L'èveque	" " "	0.65	-	Jacquet y Tantaoui-Elers, 1976
Bonbel	Entero	39		
Gouda	"	97.5		
Pyrénées	"	45.5		
Emmental	"	107.25		
Vache qui rit	"	42		



Tabla IV.1 .- (Continuación)

Tipo de queso	Características de incubación	Contenido máximo afl.totál en µg/g	Profundización aflatoxinas	Autores
Cottage	25°C 12 días	0.4	-	Burzynska, 1977
Swiss Mozzarella	Porciones 25°C 14 días	0.05	-	Lieu y Bullerman, 1977
Provolone	Entero 20°C 3-40 días	0.0446	20 mm	Kiermeier y Behringer, 1977
Tilsit	Entero 14°C MR 95% 18-52 días	0.1066	10 mm	Kiermeier y Behringer, 1977
Tilsit	Rallado 5°C 21 días	0.11	-	Kiermeier y Behringer, 1977
Queso para fundir	25°C 90% MR 2-16 días	0.1215	-	Polzhofer, 1977
Tilsit	Porciones Esterilizado 16-27°C 11-20 días	2.2	-	Engel, 1978
Cottage	Porciones 15-25 °C 10-21 días	28	20 mm	Park y Bullerman, 1983
Cheddar	Porciones	318	-	
Cheddar	Porciones 3-28 días	800	-	Park y Bullerman, 1983
Feta	Porciones 13-26 °C 7-25 días aw 0.92-0.94	3.736	24 mm	Karatoannoglou, 1984
Teleme	Porciones 16-25 °C 3-7 semanas	9	20 mm	Zerfiridis, 1985

produjeron en porciones de queso: 131.9 y 136.8 µg/g, y sobre queso triturado: 158.28 µg/g, siendo uno de los más altos de los descritos en la literatura. Como podemos apreciar en la mencionada tabla, se encuentra a los niveles descritos para los quesos: Queso de cabra (331 µg/g), Gouda (97.5 µg/g) y Emmental (107.25 µg/g), todos ellos valores obtenidos en un estudio llevado a cabo por Jacquet y Tantaoui-Elaraki (153), siendo el primero un estudio sobre porciones, y los dos últimos sobre queso entero. El nivel máximo descrito en la literatura ha sido 800 µg/g en porciones de queso Cheddar (256) y los 318 µg/g descritos en otro estudio por estos mismos autores (255).

La mayor parte de las distintas experiencias fueron realizadas en porciones de queso y no sobre quesos enteros.

El queso Manchego fue utilizado como sustrato para producción de aflatoxinas por Sanz et al. (314), utilizando 100g de queso desmenuzado que eran inoculados con 100 ml de un cultivo líquido Czapeck donde había crecido la cepa aflatoxicogénica durante 7 días a 30°C. Los valores descritos después de 12 días a 30°C fueron 0.5 µg aflatoxina total / g, inferiores a los 4.37 µg/g encontrados por nosotros en pasta de queso. Debe tenerse en cuenta que durante el periodo de incubación del medio Czapeck llegarían a producirse aflatoxinas, que por tanto nos alterarían los resultados obtenidos sobre el queso Manchego, que sería inoculado con aflatoxinas junto con la cepa toxicogénica.

A pesar de que para ciertos autores (275) la producción de aflatoxinas va paralela al desarrollo miceliar, hay quesos en que si bien se describe un abundante crecimiento de la cepa aflatoxicogénica empleada, posteriormente no se detectaron aflatoxinas, como sucedió en los quesos Mimolette, Roblochon, Edam y Boursin au Poivre (153). No se encuentra explicación clara a este hecho, aunque en el caso del Boursin au Poivre se especula con el posible efecto inhibidor de la síntesis de aflatoxinas que puede tener la pimienta.

La producción de aflatoxina  $M_1$  en queso ha sido descrita por muy pocos autores (174, 175, 275), pero consideramos que se debe más a una falta de interés en su detección, o dificultad de la misma por la aparición de sustancias interferentes en la cromatoplaque, que a una ausencia real de dicha aflatoxina.

Si bien en un principio se pensó que la aflatoxina  $M_1$  únicamente procedía de la metabolización que el ganado lechero efectuaba de la toxina  $B_1$ , pronto se estableció la capacidad que algunas cepas de A.flavus y A.parasiticus tienen para sintetizar aflatoxina  $M_1$  (146, 152, 251, 282, 295).

Por tanto, y estableciendo diferenciación en cuanto a la temperatura de incubación, podemos decir:

A 26 °C los mayores niveles de aflatoxinas fueron detectados en queso triturado, seguido del habido en porciones de queso, y ambas superiores a la producción en pasta de queso. La

menor producción fue detectada sobre queso entero, lo que habla de la importancia de la corteza como factor de freno ante las invasiones fúngicas.

A 15°C la producción fue muy similar en porciones, pasta y queso entero, lo que indica que en este caso el factor limitante es la temperatura, más importante que el substrato (incluida la acción de la corteza). Es curioso remarcar que a 15°C no pudo ser detectada producción de aflatoxinas en queso triturado, como consecuencia del crecimiento competitivo con hongos del Género Penicillium.

En ninguno de estos substratos se detectó producción a 10°C, aun cuando en la pasta de queso el crecimiento fue evidente.

Si bien se ha descrito que substratos con amplia superficie y elevado grado de nutrientes y humedad son potencialmente buenos para la producción de aflatoxinas (394), en el caso de los quesos debemos contar con su corteza, que actúa como freno de las invasiones fúngicas (11, 113, 153, 167, 194, 363). Esto aun cuando tengan un alto contenido en humedad interna. La corteza no deja penetrar el micelio fúngico al interior. En experiencias llevadas a cabo por Jacquet y Tantaoui-Elaraki (153), no se detectaron aflatoxinas cuando el hongo creció sobre quesos enteros, y sí cuando lo hacía sobre porciones internas de los mismos. Tantaoui-Elaraki y Khabbazi (363) describen que la parte central del queso es poco favorable al crecimiento el primer día de fabricación, permitiendo un buen crecimiento si el queso es de más edad:

por contra, la parte superficial, que en el primer día no se distingue del resto del queso, se transforma en más refractaria con el paso del tiempo.

De los resultados obtenidos por nosotros resulta bien evidente, como era lógico pensar, que el almacenamiento en refrigeración previene la producción de aflatoxinas en queso. La menor temperatura de producción de aflatoxinas en quesos ha sido descrita en Queso Brick: 12.8°C (330), Queso Feta: 13°C (167) y Queso Tilsit: 14°C (175). En otros intentos de distintos autores sobre diferentes tipos de quesos no se ha encontrado producción por debajo de 15°C, aun cuando en algunos casos haya podido aparecer crecimiento (104, 200, 250, 255, 256, 299, 408).

Como cuestión aparte, y excepción a lo anteriormente indicado, debemos señalar 2 experiencias: La primera es la efectuada por Kiermeier y Groll (179), que utilizando queso Tilsit como sustrato, no encuentran producción a 16°C con A.flavus y A.parasiticus y sí a 18°C. En esta misma experiencia, se describe la producción de aflatoxinas a 5, 10 y 15°C por una cepa de Penicillium puberulum, si bien la capacidad aflatoxicogénica de esta especie no se ha confirmado posteriormente. En el principio de las investigaciones sobre cepas aflatoxicogénicas, se describió la capacidad de producción de aflatoxinas por distintas especies fúngicas: Hodges et al. (144) describieron producción de E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> por Penicillium puberulum.

Kulik y Holaday (190) incluyeron como cepas productoras de B<sub>1</sub> a distintos miembros del Género Aspergillus ( A.niger , A.ruber , A.wentii ) y Penicillium ( P.variable , P.citrinum y P.frequentans ). Scott et al. (316) incluyeron como cepa aflatoxicogénica a A.ostianus , perteneciente al grupo A.ochraceus . Basappa et al. (23) citaron el A.oryzae.

Finalmente, Van Walbeek et al. (382) incluyeron 2 especies de Aspergillus : A.ochraceus y A.flavus , y 4 especies de Penicillium : P.citrinum , P.uberulum , P.frequentans y P.variable . También citan producción por una especie del Género Rhizopus .

A pesar de estas dudas iniciales, desde hace años quedó establecido que las únicas cepas productoras de aflatoxinas se encontraban dentro de Aspergillus\_\_flavus y A.parasiticus (142).

La segunda experiencia a la que nos referimos es la de Kiermeier y Behringer (174) que describen producción por A.parasiticus a 5°C.

En ambos casos consideramos que la posibilidad de aparición de sustancias interferentes con el mismo R<sub>f</sub> que las aflatoxinas B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub> no debe ser descartada, por cuanto son los únicos resultados positivos descritos en la literatura a una temperatura tan baja.

Otro factor que podría incidir negativamente sobre la

producción de aflatoxinas sería el contenido en ClNa, pero es a niveles superiores al 4% cuando ejercería dicha acción inhibitoria (331), que no alcanza al del queso Madurado. Como dato indicativo citaremos que el queso Manchego debe tener un contenido máximo en cloruro sódico del 2.3% (35); incluso Kiermeier y Behringer (174) demostraron en queso fresco y Camembert que con el incremento en sal, se va incrementando el contenido en aflatoxinas.

Lie y Marth (199) determinaron que el pH óptimo para crecimiento de A.flavus en queso Cottage fue de 3.42 a 5.47, que abarca el pH del queso Madurado: 4.9 a 5.5 (131).

Podemos concluir diciendo que el queso como sustrato, constituido esencialmente por caseína y materia grasa, prácticamente desprovisto de lactosa, debería constituir un buen medio de cultivo y toxicogénesis (157, 363), pudiendo considerar adecuados aquellos quesos con bastante tiempo de maduración, elevada humedad y los que deben ser liberados de una flora fúngica contaminante espontánea (170). Las proteínas y/u otras sustancias encontradas en la caseína son adecuadas para mantener la producción de aflatoxinas, pero no para que ésta sea máxima (11, 55).

#### IV.6.c. Limpieza y parafinado de los quesos

La mayor parte de los quesos elaborados por nosotros presentaron contaminaciones fúngicas extrañas al hongo inoculado, representadas por miembros del Género Penicillium; esta contaminación consideramos proviene principalmente de la salmuera, por cuanto los quesos inmersos en salmuera estéril no presentaron este problema, al menos de una forma tan intensa. El papel de la salmuera en la contaminación de los quesos ya fue sugerido por Zerfiridis (406). Los Aspergillus eran reconocidos por sus zonas de esporulación de color amarillento, frente al color verde típico de los Penicillium (57). En algunos casos (255) se han descrito altos niveles de producción de aflatoxinas sin que hubiera esporulación, lo que supone un claro peligro debido a la falta de color típico de los hongos aflatoxicogénicos, y que puede alertar de su presencia. Consultada la Industria elaboradora de quesos que colaboró en nuestros estudios, nos fue manifestado que el problema del enmohecimiento es muy común en este tipo de quesos, que antes era solucionado por la aplicación de pimaricina a la corteza (hoy día procedimiento prohibido por la legislación), y actualmente se trata simplemente con la limpieza periódica de la parte externa de los quesos con la ayuda de un paño húmedo (J.Lizarralde, comunicación personal); éste fue el procedimiento seguido por nosotros, y es también práctica común en otros tipos de queso (173, 175, 230, 364), aunque, refiriéndonos al problema concreto de la síntesis de aflatoxinas, como práctica aislada, si no se acompaña de otros procedimientos (envoltura en bolsa de



plástico o parafinado), no es de gran utilidad, por cuanto elimina sólo parcialmente las hifas que hayan penetrado en la corteza (173); por otra parte, por el lavado, la capa externa se hace más adecuada a la difusión de aflatoxinas hacia el interior, y por supuesto no es efectivo una vez que el queso es cortado por el consumidor (230).

Los hongos del Género Penicillium constituyen los contaminantes habituales de los distintos tipos de queso, tanto durante su madurado como a lo largo de su almacenamiento en refrigeración (50, 58, 242), y aunque en menor grado, también es posible la presencia de Aspergillus (150, 363). No debemos olvidar que ambos Géneros pueden verse incluidos en determinados casos más que como contaminantes, como contribuidores al proceso de maduración del queso (102).

La competencia entre Penicillium y Aspergillus es clara, siendo A.flavus y A.parasiticus parcialmente inhibidos por Penicillium sp., y por tanto, reducida su capacidad de producción de aflatoxinas (394). Esto hace que quesos madurados por starter fúngico se muestren refractarios a la invasión por Aspergillus y consiguiente producción de aflatoxinas (247, 363). Así, no ha podido ser descrita dicha producción en los quesos Camembert y Romadur (179), en Roquefort, Camembert y Blue (407). En queso Brick, Shih y Marth (330) detectan valores mucho menores que en Cheddar, lo que atribuyen a la acción de algunas levaduras y del Brevibacterium linens en el queso Brick. Con respecto al

queso Camembert, Kiermeier y Behringer (174) describen la producción de aflatoxinas a 28 °C, aunque sin especificar detalles de la experiencia llevada a cabo, que parece más bien un estudio sobre la influencia de distintas concentraciones de cloruro sódico.

Tampoco se debe olvidar la posible acción que sobre los hongos aflatoxicogénicos pueden tener las bacterias encargadas de la fermentación de ciertos quesos; a pesar de que en estudios con medios sintéticos se ha descrito capacidad inhibidora de la síntesis de aflatoxinas por Streptococcus lactis y Lactobacillus casei (101), e incluso la capacidad de degradación de la aflatoxina presente por S. lactis (76), parece que en condiciones naturales la acción de estos fermentos lácticos sobre Aspergillus productores de aflatoxinas es mínima (363).

Dentro de los estudios de producción de aflatoxinas en queso tras inoculación en superficie con micelio y esporas conjuntamos las dos posibilidades existentes: quesos sin limpiar (Q6 y Q8) y quesos limpiados (Q5, Q7 y Q9). Esto se completó con estudios sobre influencia del parafinado (Q5, Q6 y Q7 fueron parafinados, proceso que no se llevó a cabo en Q8 y Q9). El parafinado se realiza a los 15 días de maduración, deteniéndose en ese momento el desarrollo fúngico; por tanto, en caso de producción de aflatoxinas, el hongo sólo dispone de 15 días para hacerlo. A este respecto, de todos estos quesos el único que presentó presencia de aflatoxinas fue el

Q7, similar en su proceso de elaboración seguido al Q5, diferenciándose únicamente en que la toma de muestras tuvo lugar a los 30 días de madurado en Q7 y a los 60 en Q5, pudiendo explicarse este fenómeno por el hecho de que tras la detención de la producción de aflatoxinas con el parafinado, vendría su degradación, que a los 30 días no da tiempo a completarse, mientras que sí puede llevarse a cabo en 60 días. Esto mismo podría ser válido para Q9, ya que no se aprecia crecimiento tras la limpieza del mismo, dando tiempo a la posible metabolización de las aflatoxinas en los 60 días de madurado.

Se debe tener en cuenta asimismo que por lavado de la cuajada puede disminuir la aflatoxina B<sub>1</sub> presente en un 22%, con lo cual durante el proceso de limpiado de los quesos con un paño húmedo podríamos ocasionar la eliminación parcial de las toxinas.

En Q6 y Q8 puede considerarse lógica la no presencia de aflatoxinas por tener que soportar crecimiento competitivo, mucho mayor en Q8, donde no se parafina, llegando el Penicillium a cubrir literalmente los pequeños focos de Aspergillus tras los 60 días de madurado. Esto mismo es lo que sucede en Q1 y Q2 (Quesos parafinados). Este proceso de hongos atóxicos creciendo y tapando el desarrollo de hongos tóxicos ya ha sido señalado anteriormente en otro tipo de quesos (40B).

En cambio, en Q3 y Q4, salados por inmersión en salmuera estéril y no parafinados, se aprecia ligera producción de aflatoxinas tras los 60 días de madurado: no se detiene su

desarrollo por parafinado, ni sufren crecimiento competitivo intenso, si bien al final del madurado (en Q11) aparecen focos de Penicillium, que durante la incubación a 28°C son superados en intensidad de crecimiento por el Aspergillus inoculado.

La posible degradación de las aflatoxinas que parece tener lugar en Q5, Q7 y Q9 ha sido apreciada por otros autores sobre distintos tipos de queso. Kiermeier y Behringer (174) ya advierten que en el queso se ha de contar con una posible reducción de las aflatoxinas hasta el nivel cero. Lie y Marth (198) en queso Cheddar contaminado con A.flavus encontraron valores de aflatoxinas superiores tras 1 semana de incubación a los hallados en la 7ª semana, con un descenso que en G<sub>1</sub> iba de 14.4 a 1.9 µg/g, y en E<sub>1</sub> de 2.9 a 1.9 µg/g; esto sucede en la capa superficial, mientras que en la segunda capa de 0.64 cm los valores siguen aumentando por una mayor difusión de las aflatoxinas. Kiermeier y Groll (179) en queso Tilsit advierten un aumento de aflatoxinas en los primeros días, y después una disminución. Shih y Marth (330) en queso Brick a 12.8 °C detectan aflatoxinas en las semanas 1, 2 y 4, pero no en la 14. Kiermeier y Behringer (175) en queso Provolone también citan valores oscilantes. Mohran et al. (235) en queso para fundir dan una inflexión de menor producción de aflatoxinas en el día 14. Park y Bullerman (255) en queso Cottage detectan más aflatoxinas a los 10 días que a los 21. Karaibannoglou (167) en queso Feta detecta más aflatoxinas a los 20 días que a los 25.

Para explicar estas oscilaciones y degradaciones de las aflatoxinas distintos autores han barajado diversas posibilidades, que quizá tengan todas algo de cierto y parte de responsabilidad en estos procesos:

- Algunas cepas aflatoxicogénicas pueden degradar una porción de las aflatoxinas después de producirlas como consecuencia de una vigorosa formación de esporas (179).

- La disminución de aflatoxinas se produce por la acción de diversos microorganismos que pueden estar presentes en el queso (76, 179).

- Desde el punto de vista analítico, debemos tener en cuenta las dificultades para la extracción de aflatoxinas en queso que pueden dar lugar a esas oscilaciones, por la dificultad de su extracción, su gran contenido en grasa y la acción de los diferentes productos de maduración (170).

- Procesos de degradación química o enzimática que tienen lugar durante el madurado del queso. En condiciones óptimas para el hongo, la producción de aflatoxinas sería muy superior a su degradación, "tapando" ésta (175, 330).

- Cuando el queso es blando (o se encuentra en sus primeras fases de maduración) se detecta menor cantidad de aflatoxinas porque tiene menor masa seca (184).

- Los péptidos producidos durante la proteólisis pueden ser responsables de la destrucción parcial de las aflatoxinas (136).

#### IV.6.e. Tipo de inoculación

No hubo diferencia aparente entre la inoculación con suspensión de esporas y la efectuada con asa cargada (esporas + micelio), toda vez que en el interior del queso hubo ausencia de crecimiento en todos los casos.

Cuando se inocula asa cargada en superficie, debido al proceso de formación de la corteza, ésta va englobando el inóculo y el ligero crecimiento habido a partir de él, de forma que cuando se procede a la limpieza del queso, el micelio queda como incrustado en la corteza en los puntos de inoculación: esto no se tradujo en crecimiento hacia el interior o en una mayor producción de aflatoxinas.

En cuanto al tamaño del inóculo, Burzynska (63) en estudios sobre Cottage encontró que la cantidad de aflatoxinas producida fue relativamente independiente del número de conidios inoculados. Por el contrario, Tantaoui-Elaraki y Khabbazi (363) utilizando como medio de cultivo leche entera homogeneizada, encuentran que las suspensiones débiles de

esporas son más favorables a la toxicogénesis que las suspensiones densas. Esto ha sido comprobado por otros autores sobre distintos substratos (75, 369).

#### IV.6.f. Profundización de las aflatoxinas

En Queso entero únicamente se detectó producción de aflatoxinas a 15°C en quesos salados por inmersión en salmuera estéril y no parafinados (Q3 y Q4). En este caso sólo se detectaron las toxinas en la capa externa. La profundización sólo pudo ser apreciada cuando el queso fue mantenido 30 días a 28°C, ya fuera tras 30 días de madurado (Q11) o tras 60 (Q10). En ambos casos sólo se detectaron aflatoxinas hasta la segunda capa de 10 mm, no pudiendo ser detectada en la tercera, con lo que la profundización en queso Madurado a través de la corteza será como máximo de 20 mm.

En la producción sobre una porción interna, se hizo el estudio de profundización hasta una segunda capa de 5 mm.

Los porcentajes de aflatoxinas encontrados en estas capas inferiores en relación a los encontrados en la porción superior son los reflejados en la siguiente tabla:

	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	Total
Q11	0.68%		0.65%			0.59%
	9.6%		7.3%			5.94%
Q10	0.45%		1.14%			0.78%
T7-B	24.1%	14.5%	21.79%	29.06%	19%	22.9%

En Q11 y Q10 sólo se detectó profundización de B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub>, aunque consideramos que lo que ocurre es que las otras aflatoxinas (B<sub>2</sub>, G<sub>2</sub> y M<sub>1</sub>) si profundizan, pero no son detectadas por la técnica de extracción en niveles tan bajos. En T7-B son lógicos los valores tan elevados, debido a que la profundización es de 5 mm en relación con los 10 mm de los quesos, además de no tener el obstáculo que representa la corteza.

En la tabla IV.2 podemos apreciar los valores en porcentaje de aflatoxina que difunde en relación a la obtenida en la capa superficial, obtenidos por distintos autores en diferentes tipos de queso, y comparar con los encontrados por nosotros. En general, los resultados son comparables a los nuestros, exceptuando los obtenidos por Shih y Marth (330), que dan un alto grado de profundización (30-40 mm), con un alto porcentaje de aflatoxinas en estas capas profundas: esto podría achacarse al hecho de que el queso Brick es un queso



Tabla IV.2 .- Difusión de aflatoxinas en distintos tipos de queso expresado en porcentaje de toxina en la capa profunda en relación con la presente en la capa superficial

Tipo de queso	Capa en mm	% A F L A T O X I N A S		Autores
		B <sub>1</sub>	G <sub>1</sub>	
Cheddar	6.4 - 12.8	0.16 - 6.1	0.06 - 6.1	Lie y Marth, 1967
Tilsit	5 - 10	10	3.4	Frank, 1968
Brick	10 - 20	a	25.9 - 107.1	Shih y Marth, 1972
		b	75 - 103.2	
	20 - 30	a	25.9	
		b	50.8 - 66.7	
	30 - 40	a	25.9	
		b	24.3	
Provolone	2 - 5	41.9 - 100	46.6 - 52.9	Kiermeier y Behringer, 1977
	5 - 10	12.5 - 36.8	37.5 - 58.6	
	10 - 20	10.5	19.1	
	Tilsit	5 - 10	1.14	
Feta	8 - 16	c	1.2 - 15.3	Karaioannoglou, 1984
		d	0.16 - 2.6	
	16 - 24	c	0.93	
		d	0.1 - 1.49	
Teleme	10 - 20	e	10.1	Zerfiridis, 1985
		f	9.88	

a.- 12.8°C  
b.- 23.9°C

c.- 13°C  
d.- 26°C

e.- 16°C  
f.- 25°C

blando. Si exceptuamos este trabajo, el resto de los aparecidos en la literatura dan un grado de profundización de aflatoxinas en queso similar al descrito por nosotros (10-20 mm); estos trabajos son: Lie y Marth (198) dan una profundización de 6.4-12.8 mm en Cheddar; Frank (113) en Tilsit encuentra aflatoxinas hasta la capa de 5-10 mm; Kiermeier y Groll (179) en Tilsit hasta 6-13 mm; Kiermeier y Behringer (175) en Provolone hasta 10-20 mm, y en Tilsit hasta 5-10 mm; Park y Bullerman (255) en queso para fundir hasta 10-20 mm; Karaioannoglou (167) en Feta hasta 16-24 mm; Zerfiridis (408) en Teleme hasta 10-20 mm.

Aunque para ciertos autores la aparición de aflatoxinas en capas inferiores sería discutible de atribuir a la penetración del micelio o a la propia difusión de aflatoxinas, o a ambos factores a la vez (170), parece más adecuado pensar que el micelio, sobre todo en quesos de pasta dura, no penetra hacia el interior (113, 167), por lo que serían las aflatoxinas las que difundirían. En esta difusión sería un factor importante la alcalinización superficial por formación de carbonato amónico principalmente.

También parece claro deducir que el contenido de aflatoxinas en las capas profundas se incrementará con el envejecimiento progresivo del cultivo (179), y que en general, la concentración de aflatoxinas será menor conforme se incrementa la distancia de la superficie (330).

#### IV.6.g. Producción B:G

\* En quesos enteros, aquellos mantenidos únicamente a 15 °C (temperatura de maduración) se produce mucha más G<sub>1</sub> que B<sub>1</sub>, y sorprende la elevada proporción de G<sub>2</sub>, a nivel de B<sub>1</sub> (Q4) e incluso superior (Q3 y Q7).

Cuando los quesos son incubados a 28 °C, si bien se produce más G<sub>1</sub> que B<sub>1</sub>, no alcanza diferencias tan considerables como a 15 °C; existe siempre producción superior de B<sub>1</sub> que de G<sub>2</sub>.

\* En porciones internas, queso triturado y pasta esto no sucede exactamente así: En porciones, G<sub>1</sub> se mostró ligeramente superior a B<sub>1</sub> en queso comercial (15 y 28 °C) y en queso elaborado por nosotros (20 días a 28 °C). En queso elaborado por nosotros a 28 °C, en 8 y 11 días la G<sub>1</sub> fue muy superior a la B<sub>1</sub>. En ningún caso se detectó más G<sub>2</sub> que B<sub>1</sub>.

\* En queso triturado a 28 °C la proporción fue 1/1.

\* En pasta de queso, con excepción del sustrato (11 días a 28 °C) en que B / G fue 1/1, la proporción fue muy superior a G<sub>1</sub>, no encontrándose en ningún caso más G<sub>2</sub> que B<sub>1</sub>.

En los estudios llevados a cabo por otros autores sobre distintos tipos de queso, cuando emplean una cepa productora de las 4 aflatoxinas principales, suelen encontrar, al igual que nosotros, una mayor producción de G<sub>1</sub> que de B<sub>1</sub>, en distinto grado según la temperatura de incubación (104, 167,

174, 175, 198, 255, 275, 330, 408). Esto se ha visto refrendado por los estudios de Kiermeier (170), que en condiciones naturales, a partir de quesos comerciales Parmesano y Emmental determina más  $G_1$  que  $B_1$ . Citar como excepción los trabajos de Park y Bullerman (256) en Cheddar, que en estudios con una cepa de A.flavus, a todas las temperaturas investigadas dió lugar a 2-4 veces más  $B_1$  que  $G_1$ .

Se ha demostrado que el grado de producción de cada aflatoxina es dependiente, además de la cepa, de la temperatura, pudiendo afirmar que en general la aflatoxina B tiende a predominar a altas temperaturas, mientras que es la aflatoxina G la que predomina a bajas temperaturas (72).

Un hecho descrito en muy pocas ocasiones en la literatura es el observado por nosotros en los quesos Q3 y Q7, en el sentido de una mayor producción de  $G_2$  que de  $B_1$ ; se ha descrito para ciertas condiciones de incubación en quesos Brick (330) y Teleme (408).

Kiermeier y Behringer (175) describen en queso Provolone la alta producción de  $M_1$ , a nivel superior a  $B_2$ , e incluso en ocasiones a  $G_2$ .

La distribución de aflatoxinas en micelio/substrato sólo se pudo determinar en pasta de queso, único substrato sobre el que la separación de ambos fue llevada a cabo. A 28°C, únicamente la  $G_1$  es superior en micelio que en substrato; para el resto de las aflatoxinas sucede al revés, pero el

hecho de que la G<sub>1</sub> sea la más abundante con diferencia, hace inclinar a favor del micelio el valor de las aflatoxinas totales.

A 15°C la producción de cada una de las aflatoxinas es superior en micelio que en substrato.

Nuestros resultados se muestran de acuerdo con la afirmación de Kiermeier y Groll (179), en el sentido de que en los primeros días de incubación hay mayor porcentaje de aflatoxinas en el micelio, cambiando después la relación en favor del substrato. Por contra, experiencias efectuadas en queso Cheddar (198) y Teleme (408) muestran que la concentración de aflatoxinas en micelio fue sustancialmente superior que en el queso.

#### IV.6.h. Pigmentación amarillenta del substrato

En todos los substratos estudiados (queso entero, porciones, triturado y pasta) se apreció una pigmentación amarillenta del substrato sobre el que crecía el Aspergillus parasiticus que va paralela a la producción de aflatoxinas por parte del hongo. A mayor producción de aflatoxinas se apreció una mayor intensidad de pigmentación.

Esta pigmentación amarillenta paralela a la producción de aflatoxinas ha sido observada por otros autores en quesos

Feta (167) y Teleme (408), profundizando unos 10-20 mm hacia el interior del queso. Consideramos que éste es un factor más que nada dependiente de la cepa aflatoxicogénica empleada, y que si no había sido descrita anteriormente por otros autores no se debe a la ausencia de la mencionada pigmentación, sino a la falta de producción de la misma por las cepas estudiadas, o a la falta de observación de la misma, por considerarla carente de importancia, y no digna de ser citada.

Diferentes autores han comprobado sobre distintos medios de cultivo la aparición de esta pigmentación amarillenta paralela a la producción de aflatoxinas, ya sea sobre medios naturales (15, 72, 138, 221, 337) o sintéticos (75). La intensidad de esta pigmentación amarilla se ha relacionado con la concentración de aflatoxinas producidas (221, 319).

#### IV.7. AFLATOXINAS DURANTE EL PROCESADO DEL QUESO MADURADO

##### IV.7.a. Contaminación de la leche con aflatoxinas

Dicha contaminación se llevó a cabo de forma artificial por la incorporación a la leche de una solución de bicarbonato sódico al 1% donde se encontraban las aflatoxinas. Se efectuó de esta manera para conseguir la inmediata distribución homogénea de las aflatoxinas en toda la leche. Si se realizara la contaminación con aflatoxinas en cloroformo, éste no se distribuiría en la leche, y al tratarse de un recipiente con 17.5 L, proceder a la eliminación de la totalidad del cloroformo sería un proceso largo y difícil de realizar. Es por esto que preferimos llevar a cabo la contaminación con la solución de bicarbonato.

##### IV.7.b. Parafinado de los quesos

Se procedió al parafinado de los quesos a los 15 días de su madurado con objeto de eliminar la posibilidad de contaminación de la corteza por distintas cepas de Aspergillus y sobre todo de Penicillium, que podrían llevar a cabo una cierta detoxificación de las aflatoxinas. En efecto, se ha descrito que algunos hongos pueden transformar parcialmente las aflatoxinas a nuevos compuestos.

Esto sería un proceso no específico, atribuido a hongos productores de acidez (72, 129).

#### IV.7.c. Influencia de las aflatoxinas sobre la población bacteriana de la leche y el cultivo iniciador

En los recuentos efectuados, con respecto a las bacterias presentes en leche + cuajo, en el queso contaminado con aflatoxinas se produce una pérdida del 68.7% de bacterias, mientras que en el queso control ésta sería únicamente del 40.45%; Esta diferencia sería aún mayor si tenemos en cuenta que durante el tiempo de reposo en que se mantiene la leche contaminada, se producirá una multiplicación bacteriana, que no se dará en la leche control por no dar tiempo a que ésta se desarrolle al no mantener ese periodo de reposo.

Por tanto, si bien durante el proceso de elaboración del queso tiene lugar una pérdida de bacterias, ésta es superior cuando la leche se encuentra contaminada con aflatoxinas, por la acción tóxica que éstas podrían desarrollar.

La baja recuperación de bacterias en cuajada elaborada a partir de leche contaminada puede deberse por una parte a la acidificación por el reposo, que puede desviar las bacterias fundamentalmente hacia el suero, y por otra, a que en la cuajada se produce una mayor concentración de aflatoxinas, y por tanto, causarían mayor acción tóxica.

Se ha descrito que las aflatoxinas pueden influir las características morfológicas y fisiológicas de bacterias



ácido-lácticas (226, 234, 359). Para ciertos autores, algunas de estas bacterias, como S.lactis y otros estreptococos, quedarían libres de dicha acción tóxica (76, 235), mientras que sí serían afectados miembros del Género Lactobacillus (235, 359). Parece ser que la actividad antibiótica de las aflatoxinas es función del pH del medio, siendo máxima a pH 6 (38).

#### IV.7.d. Influencia del proceso de elaboración del queso Madurado sobre las aflatoxinas

Debemos establecer comparación entre los resultados obtenidos para los 2 lotes elaborados.

Con respecto a la distribución de aflatoxinas en suero/cuajada, en el lote 1, como consecuencia del mantenimiento de 30 minutos de reposo, con la consiguiente acidificación (pH pasa de 6.3 a 6.1 en este tiempo), se observa para aflatoxina B y M<sub>1</sub> una mayor concentración en la cuajada en relación a lo que sucede en el lote 2, muy elevada para aflatoxina B y más ligera para M<sub>1</sub>. Esto indica que, como consecuencia de una mayor acidificación, las aflatoxinas quedan más retenidas en las micelas caseínicas de la cuajada, y son disueltas en menor medida en el suero. Esto no sucede así para la aflatoxina G, donde se obtuvieron resultados contrarios a los de B y M<sub>1</sub>.

En conjunto nuestros resultados muestran una mayor proporción de aflatoxinas en suero que en cuajada, para los dos lotes y para todas las aflatoxinas estudiadas; ahora bien, en relación proporcional al peso, mayor cantidad de aflatoxinas fueron detectadas en cuajada.

A lo largo de los estudios efectuados en los últimos años por diversos autores, la forma de contaminación indirecta de productos lácteos en general, y queso en particular, sólo ha sido investigada para  $M_1$  por representar la principal forma de eliminación de aflatoxinas en la leche (363). Nosotros completamos nuestros estudios con las 4 aflatoxinas principales,  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$  y  $G_2$ , basándonos en la posibilidad de utilización de leche concentrada contaminada para enriquecer la leche a partir de la cual se elaboraría el queso. Esto hace que carezcamos de datos de otros autores en cuanto a distribución de aflatoxinas B y G en suero/cuajada, debiendo limitarse nuestra discusión a los resultados obtenidos para  $M_1$ . Al referirnos a los resultados obtenidos por otros autores, los daremos en forma de aflatoxina total en suero y cuajada, pues en general, a igual relación de peso, el reparto de  $M_1$  sería 1/1 (213).

La distribución de aflatoxina  $M_1$  en suero/cuajada encontrada por nosotros fue de 65.92/21.78 para el lote 1, y 68.1/21.34 para el lote 2, viniendo establecida esta pequeña diferencia por las distintas pérdidas que se producen durante el proceso de elaboración, que fueron ligeramente superiores para el

lote 2.

Estos valores son similares a los descritos para el queso Ricotta: 74/30 (355) y 70/30 (Wilson y Hayes citado en 11); se trata de un queso blando, precipitado con bacterias ácido-lácticas + calor, con un pH elevado (5.9-6) y una cuajada pequeña y granular.

Valores de recuperación de aflatoxina  $M_1$  superiores en suero con respecto a la cuajada han sido descritos en queso Cottage: 71/40 (355), 86/14 (350), y en queso Blanco: 61/39 (401).

En la literatura aparecen resultados muy dispares, que quedan reflejados en los 2 extremos, aquél que detecta aflatoxinas únicamente en la fracción caseínica (7), y por otra parte el que la detecta sólo en el suero (283). Entre estos polos, se han ido describiendo valores intermedios, como los citados anteriormente, que muestran inclinación de aflatoxina  $M_1$  hacia el suero. En la tabla IV.3 se puede apreciar un listado de los datos obtenidos por distintos autores en experiencias de este tipo.

En distintas clases de queso se ha descrito distribución homogénea de  $M_1$  entre suero y cuajada: Colby, Cheddar y Swiss (355), Cottage (110, 177, 355), Queso Blanco (355), Tilsit (178), Baker (401), Gouda (379).

Valores superiores en cuajada se han descrito en Queso Fresco y Camembert (178) y en Cottage (228).

Tabla IV.3 .- Distribución de aflatoxina M<sub>1</sub> en suero/cuajada durante la elaboración de distintos tipos de queso

Tipo de queso	Distribución aflatoxinas suero/cuajada	Pérdidas en aflatoxinas	Enriquecimiento cuajada en aflatoxinas	Autores
Cottage	0 / 100	-	-	Allcroft y Carnaghan, 1963
Cottage	20 / 80	50 %	-	McKinney et al., 1973
Cottage	100 / 0	58 %	-	Purchase et al., 1972
Cottage	50 / 40	10 %	2.5 veces	Grant y Carlson, 1971
Ricotta	70 / 30	-	-	Wilson y Hayes, 1973
Colby	50 / 50	-	-	Stubblefield y Shannon, 1974
Cheddar		-	-	
Swiss		-	-	
Cottage short		-	-	
Cottage-long	47 / 45	-	-	Stoloff et al., 1975
Queso Blanco	53 / 44	-	-	
Ricotta	74 / 30	-	-	
Cottage	86 / 14	20 %	-	Kiermeier y Buchner, 1977
Tilsit	46.2 / 47.5	1 - 6 %	3.2-3.7 veces	
Camembert	41.7/57.2	-	-	
Fresco	38.5/59.4	-	-	Kiermeier y Buchner, 1977
Cottage	44.4/50.7	-	-	
Gouda	53 / 47	0 %	4.4 veces	Van Egmond et al., 1977
Camembert	60 / 45	0 - 10 %	-	Fremy y Roiland, 1979
	40 / 55			
Cottage	50 / 50	0 %	3.5 - 5 veces	Stoloff et al., 1981
Brick	-	-	1.7 veces	Brackett et al., 1982
Limburger				
Parmesano	-	-	5.8 veces	Brackett y Marth, 1982
Mozzarella	-	-	8.1 veces	
Cheddar	-	-	4.3 veces	Brackett y Marth, 1982
Cottage	45 / 55	-	2.76 veces	Finoli et al., 1983
Queso Blanco	61 / 39	-	2.84 veces	Wiseman y Marth, 1983
Baker	45 / 55	-	-	

Para explicar estas aparentes contradicciones entre los valores dados por diversos autores se han barajado una serie de factores que podrían influir en los resultados obtenidos, entre los que cabría citar:

- El proceso de fabricación del queso puede resultar muy importante (122).

- Técnica analítica de extracción de aflatoxinas: Los solventes de extracción utilizados en el método analítico pueden contribuir a la obtención de resultados variables (350). Concretamente, McKinney y Cavanagh (227) encuentran una distribución suero/cuajada de 25/75 con un método de extracción, y utilizando otro distinto, sobre los mismos substratos, la distribución resultó ser 60.4/39.6.

- Metodología seguida en cuanto al sistema de detección de aflatoxinas escogido puede ser importante (339).

- Tipo y grado de contaminación de la leche: Llevando a cabo la misma experiencia, Purchase et al. (283) y Stoloff et al. (350) encontraron resultados dispares por cuanto los primeros utilizaron un grado de contaminación 1-2 veces superior. Esto también fue estudiado por Fremy y Roiland (122), que describen claramente la dependencia de la distribución de  $M_1$  en suero respecto al grado de contaminación de la leche: 64.5% cuando la contaminación era

7.5 µg/L, y 42.3% con 0.3 µg/L. También es importante el que se trate de leche natural o artificialmente contaminada.

- Diferencias entre la leche utilizada: Puede influir la distinta alimentación, historia sanitaria de los animales, etc.

- Tratamiento de los resultados: En ocasiones no se hace referencia a la relación de peso entre suero y cuajada, o bien no se hace referencia a la aflatoxina perdida (177).

- La presencia de pequeñas porciones de cuajada en el suero que pueden contener una alta concentración en  $M_1$  pueden alterar considerablemente los resultados (40). Asimismo, debe tenerse en cuenta que pequeñas porciones de suero suelen quedar atrapadas en la cuajada (350).

- Parece ser que no existe relación entre el reparto de  $M_1$  y la cantidad de cuajo añadido o el tiempo de cuajado (177). En cambio, sí estaría influido por la temperatura. Kiermeier y Buchner (177) encontraron que de 25 a 50°C la distribución cambiaba de 42.5/57.5 a 54.3/45.7, con elevada pérdida de  $M_1$  (35%) a 50 °C. Esto en la práctica no tiene excesiva importancia, pues en la mayoría de los quesos la temperatura de cuajado es 28-35 °C, es decir, con una variación mínima. Tampoco encontraron diferencia entre cuajado por cuajo o por la acción de ácido.

- En general, la distribución de  $M_1$  en suero/cuajada viene determinada por la insolubilidad de las aflatoxinas en grasa y la adsorción de estas toxinas a la cuajada (346, 351).

Las pérdidas en aflatoxinas encontradas en el proceso de elaboración del queso Madurado son muy similares para los 2 lotes estudiados, y lo mismo sucede con el grado de enriquecimiento de la cuajada en aflatoxinas con respecto a la leche de partida contaminada.

Las pérdidas de aflatoxinas B y  $M_1$  pueden considerarse normales, rondando el 10%; Sorprenden las pérdidas descritas para aflatoxina G en ambos lotes (31.43 y 29.83 %), que parecen indicar una mayor labilidad de este tipo de aflatoxinas, que serían afectadas por los procesos enzimáticos y de acidificación que se producen durante la formación de la cuajada. También, y dados los sorprendentes resultados encontrados en cuanto a la influencia del madurado y refrigeración, podría hablarse de una especie de "secuestro" de las aflatoxinas G en el queso, como comentaremos más adelante. A este respecto, para la aflatoxina  $M_1$  se ha descrito que podría existir una unión con caseína que haría disminuir la eficacia de su extracción del queso.

Al igual que comentamos para la distribución de aflatoxinas en suero/cuajada, en el caso de pérdidas de aflatoxinas durante el proceso de elaboración, así como en el enriquecimiento de la cuajada, no se han descrito en la

literatura experiencias con aflatoxinas distintas de  $M_1$ , con lo que nuestra discusión debe limitarse a esta toxina.

La mayoría de los autores dan unas pérdidas de aflatoxina  $M_1$  durante el proceso de elaboración de los distintos tipos de queso prácticamente inaparentes, rondando el 10%, cifra considerada normal (122, 132, 177, 178, 355). Fremy y Roiland (122) detectan en la salmuera donde había sido introducido el queso un 6% de la  $M_1$  medida en el mismo, lo que supondría una explicación a las posibles pérdidas habidas durante el proceso de elaboración. Kiermeier y Buchner (178) también atribuyen a la operación de salado una pérdida de un 13% de aflatoxina  $M_1$  en quesos Camembert y Tilsit.

Otros autores (228, 282, 283) dan pérdidas muy superiores, del 20 al 50 %, lo cual es probablemente achacable a la utilización de técnicas analíticas que no permiten la recuperación de la cantidad total de  $M_1$  presente.

El enriquecimiento en aflatoxinas del queso con respecto a la leche de partida presenta valores similares en los 2 lotes para  $M_1$  (2.137 y 2.3 veces), superiores en el lote 1 para aflatoxina B (3.076 y 2.57 respectivamente), y superiores en el lote 2 para G (1.875 y 2.83).

Estos valores obtenidos por nosotros son similares a los descritos para Cottage: 2.76 (110), 2.5 (132) y Queso Blanco: 2.84 (401).

Consideramos que el grado de enriquecimiento es un valor dependiente del tipo de queso, y viene determinado en primer



lugar por la distribución de aflatoxinas en suero/cuajada, y también por la pérdida de agua durante el cuajado. La dependencia del queso viene dada por los distintos resultados descritos; así, para queso Brick y Limburger se ha descrito un enriquecimiento de únicamente 1.7 veces (40) debido seguramente al proceso de lavado que se lleva a cabo en la cuajada. En cambio en Mozzarella llega a 8.1 veces (43). Para la mayoría de los autores el grado de enriquecimiento se sitúa entre 3.5-5 veces (41, 178, 351, 400), aunque en algunos quesos, como hemos indicado anteriorente, se puede llegar a 7.9-8.3 veces (13).

Debido a este enriquecimiento de la cuajada, ya dedujeron McKinney et al. (228) que debía existir algún tipo de unión  $M_1$  a caseína; Allcroft y Carnaghan (7) supusieron que más que unión debía tratarse de un proceso de adsorción de  $M_1$  a la caseína. En cambio para Stubblefield y Shannon (355) esta unión no existiría, y si existe lo sería en grado mínimo.

Hoy día, para la mayor parte de los autores queda claro que el hecho de que la mayoría de la aflatoxina  $M_1$  quede en la cuajada significa afinidad  $M_1$ -caseína (11, 32, 42, 132, 177, 346, 400).

Esta afinidad se ha intentado demostrar por varios medios:

Kiermeier y Buchner (178) demostraron la afinidad de  $M_1$  hacia caseína y proteínas del suero por precipitación de las mismas con ácido láctico y ácido sulfosalicílico, aunque no determinaron en que podía consistir esa unión.

Applebaum et al. (10) colocaron leche ultrafiltrada con aflatoxina  $M_1$  puesta en diálisis de equilibrio con leche ultrafiltrada + caseína; tras 24 h a 7°C la porción con caseína contenía 2.5-2.9 veces más  $M_1$ . También trataron leche naturalmente contaminada con un enzima proteolítico, resultando que un 30.7% más  $M_1$  fue recuperada en leche tratada que en no tratada.

Brackett y Marth (42) describieron que efectivamente existe esa unión  $M_1$ -caseína, pero que también existe un límite de la cantidad de  $M_1$  que se puede unir. Esto explicaría por qué la cantidad de toxina recuperada disminuye con el incremento de concentración de la misma, como había sido demostrado prácticamente por Frey y Roiland (122). Para Brackett y Marth (41) puede deducirse que  $M_1$  no está unida covalentemente a la caseína, toda vez que puede ser extraída; intuyen que  $M_1$  podría estar unida por interacciones hidrofóbicas con la caseína.

Blanc et al. (32) demostraron la afinidad  $M_1$ -caseína por presión, centrifugación y acidificación de leche contaminada, confirmando por estos métodos diversos grados de enriquecimiento de la cuajada. En cambio, aplicando proteolisis no encontraron diferencia en  $M_1$  entre las muestras de leche y caseína tratadas y no tratadas con pepsina y pancreatina. Por fraccionamiento de las proteínas lactoséricas sobre Sephadex no detectaron  $M_1$  en las porciones

de Inmunoglobulinas, Lactoglobulinas y Lactoalbúminas: sólo detecta  $M_1$  en la fracción de Nitrógeno no proteico. De todos estos estudios, los autores deducen que existe una cierta afinidad  $M_1$ -caseína. Es posible que el grupo hidroxilo en posición 4, así como los grupos ceto y lactona, constituyan zonas reactivas, permitiendo por medio de puentes de Hidrógeno, la unión a algunos aminoácidos de la caseína y proteínas lactoséricas, e incluso péptidos y aminoácidos libres. Podría ser también que fuerzas de cohesión de tipo Van der Waals sean responsables de esta combinación.

IV.7.e. Influencia del proceso de maduración sobre las aflatoxinas presentes en queso Madurado

Los resultados obtenidos, tanto en el lote 1 como en el 2, muestran estabilidad a los 60 días de madurado para las aflatoxinas B y M<sub>1</sub>, con ligeras oscilaciones. Como en el apartado anterior las aflatoxinas G constituyen la excepción, por cuanto en el lote 1 al final del periodo de madurado se observa un incremento considerable, del 133%, mientras que en el lote 2 se aprecia una ligera disminución, recuperándose un 86.5% de las presentes en cuajada. No se apreció ninguna diferencia entre porción interna y externa del queso.

La mayor parte de los autores citan la estabilidad de la aflatoxina M<sub>1</sub> durante el madurado de distintos tipos de queso, con las ligeras oscilaciones apreciadas también por nosotros, que se traducen en general en una ligera liberación de la toxina (32). Así, se ha descrito esta estabilidad durante el madurado de los quesos Camembert, Tilsit y fresco (178), Gouda (379), Brick y Limburger (40), Parmesano (43), Cheddar (41).

A diferencia de lo descrito por nosotros, Kiermeier y Buchner (178) encuentran en queso Camembert una diferencia en el contenido en aflatoxinas en el interior y en la corteza, motivada por el 13% de pérdidas que se producen en la zona externa durante el salado, y que se mantiene a lo largo de

todo el madurado. Por contra, en queso Tilsit detectan un 21% más de  $M_1$  en la zona externa con respecto a la interna, que achacan a la pérdida de agua producida en esa zona externa: en este caso, si se determina  $M_1$  por contenido de masa seca, el resultado sería el mismo para ambas zonas.

Fremy y Roiland (122) en queso Camembert describen una disminución de  $M_1$  durante el madurado, tanto más fuerte cuanto más débil fue el grado de contaminación; en cambio, cuando la aflatoxina se marca con  $C^{14}$ , la actividad de este  $C^{14}$  permanece inalterable durante el madurado.

Las ligeras oscilaciones que sufren las aflatoxinas durante el madurado de los quesos han sido achacadas a diversas causas por distintos autores:

- Se puede producir disminución de aflatoxinas por la acción de diversos microorganismos que pueden estar presentes en el queso (40, 76, 179). Para otros autores los cultivos starter no influenciarían para nada el contenido en aflatoxinas (377).

- Desde el punto de vista analítico debemos tener en cuenta las dificultades para la extracción de aflatoxinas en queso por su gran contenido en grasa, la acción de los diferentes productos de maduración y su propio tamaño (41,

170).

- Procesos de degradación química o enzimática que tienen lugar durante el madurado del queso (175, 330). Si consideramos una unión  $M_1$ -caseína por interacciones hidrofóbicas, por la proteólisis se puede llegar a la existencia de menos áreas hidrofóbicas de las micelas de caseína. Por la lipólisis, aumentan los ácidos grasos, que pueden ejercer un efecto detergente sobre las uniones hidrofóbicas de la caseína. Todo esto puede hacer que la  $M_1$  sea más extraíble (41).

- Cuando el queso es blando (o se encuentra en sus primeras fases de maduración) se detecta menor cantidad de aflatoxinas porque tienen menor masa seca, con lo que con el paso del tiempo va incrementando el contenido en  $M_1$  de la masa seca (40, 178, 184).

-  $M_1$  se puede encontrar en leche y queso de forma combinada y ser detectable cuando madura el queso a través de la ruptura de esta unión. La forma combinada de  $M_1$  es soluble en agua y no puede ser extraída con cloroformo; se puede determinar de nuevo después de hidrólisis alcalina o enzimática (178).

- Los péptidos producidos durante la proteólisis pueden ser responsables de la destrucción parcial de las aflatoxinas (40, 136). Como consecuencia de esta proteólisis, se produce

amoníaco, que eleva el pH y puede ocasionar degradación de las aflatoxinas (40, 403).

El conjunto de estos factores pueden hacer inclinar la recuperación de las aflatoxinas en uno u otro sentido, si bien parece evidente que en un grado no excesivamente elevado.

Debido a estas oscilaciones, Brackett y Marth (43) concluyen que no se pueden comparar los resultados en  $M_1$  obtenidos en diferentes momentos del madurado.

#### IV.7.4. Influencia del almacenamiento en refrigeración sobre las aflatoxinas presentes en queso Madurado

En estos estudios se obtuvieron resultados dispares para lote 1 y 2, quizá debido a que para el lote 1 se hizo distinción entre porción interna y externa del queso, lo que no se tuvo en cuenta para el lote 2.

\* LOTE 1: Para la aflatoxina B se obtuvieron recuperaciones ligeramente superiores en porción interna que en externa a los 15 y 30 días, a la vez que va disminuyendo paulatinamente su recuperación con respecto a la inicial; a los 60 días, la recuperación en la porción interna vuelve a ser del 100%, mientras que en la externa se queda en un 60%.

lo que podría hablar de una posible difusión de aflatoxina B desde la capa exterior hacia capas internas.

En cuanto a  $M_1$ , a los 15 días la recuperación es superior en la porción interna, para ser superior en la externa a los 30 días. A los 60 días no se aprecia diferencia entre porción interna y externa, con una recuperación ligeramente superior al 100% (116.9).

Más difíciles de interpretar son los resultados correspondientes a las aflatoxinas G, con oscilaciones ostensibles durante el madurado, que llegan a su culminación en el día 60, obteniéndose una clara diferencia entre porción interna y externa, con valores absolutos similares a los obtenidos para aflatoxina B, lo cual sorprende por cuanto por ejemplo en el caso de la porción interna representa un incremento del 266%. En este punto debemos recordar las elevadas pérdidas de aflatoxinas G encontradas durante el proceso de elaboración, y la teoría de que si en vez de pérdidas reales fueran "secuestros", daría una más fácil explicación en este punto al haberse producido una liberación de esa aflatoxina que había permanecido hasta entonces "secuestrada". Así, si por ejemplo para el lote 1 suponemos unas pérdidas del 10% en vez del 31.43%, con una distribución en cuajada del 30% en vez del 19.11%, lo que equivaldría a 4.7  $\mu\text{g/Kg}$ , que es lo que tendríamos que tomar como 100%. Esto supondría que los 4.8  $\mu\text{g/Kg}$  detectados en la porción externa tras 60 días en refrigeración significarían aproximadamente una recuperación de poco más del 100%, y los 8  $\mu\text{g/Kg}$  de la porción interna significaría una recuperación del 170% de la



aflatoxina inicial, un valor considerable pero no tan elevado como ese 266% tan difícil de explicar de otra forma que no sea esta.

\* LDTE 2: Los resultados son más homogéneos en este lote, con oscilaciones mucho más ligeras de lo que ocurre en lote 1. A los 90 días de almacenamiento en refrigeración las recuperaciones para todas las aflatoxinas son superiores al 100%

En estos estudios valdría lo apuntado en el caso de la influencia del madurado, acerca de las distintas causas que pueden traducirse en oscilaciones de las aflatoxinas que van siendo recuperadas durante la refrigeración.

A pesar de estas oscilaciones, y de las en cierto modo sorprendentes recuperaciones de aflatoxinas que se producen en algunos casos (sobre todo en G), se puede concluir la estabilidad que presentan las aflatoxinas en el queso Madurado, tanto tras su madurado como durante su almacenamiento en refrigeración hasta 90 días.

Con respecto a estos estudios, sí disponemos de datos referentes a las aflatoxinas B y G, permaneciendo estables tras 4 semanas a 20°C en queso fundido (183), al igual que en queso Swiss durante 168 horas a 5°C (200).

Con respecto a M<sub>1</sub>, la mayor parte de los autores describen resultados similares a los nuestros en cuanto a estabilidad

de esta aflatoxina tras almacenamiento de diferentes tipos de queso: Gouda, 6 meses (379), Cottage 2 semanas (13), Brick y Limburger, 26 semanas (40), Mozzarella, 19 semanas (43), Queso para fundir, 8 semanas (41), Queso Blanco, 2 meses y Bakers 1 mes (401). En todos estos casos aparecen ligeras oscilaciones en los valores recuperados, como ya hemos comentado en el estudio de la influencia del madurado, y en general se percibe un ligero incremento de la aflatoxina recuperada, como consecuencia de la disminución del extracto acuoso del queso y de la mejor capacidad de extracción de las toxinas.

En cambio, en leche, diversos estudios de la estabilidad de  $M_1$  en refrigeración, hablan de una disminución de su contenido (92, 96, 180, 228). Esta disminución ocurre más rápidamente en leche contaminada de forma natural que en la contaminada artificialmente (180).

Por contra, otros autores describen la estabilidad de  $M_1$  en leche:

Stoloff et al. (350) tras almacenamiento a 4°C-17 días en leche contaminada artificialmente.

Patterson et al. (260) tras 21 días a 4°C en leche con metabisulfito sódico.

Applebaum et al. (10) en leche desnatada y suero de mantequería tras 4 meses.

Blanc et al. (32) tras 10 meses a 20°C aumenta la  $M_1$  más del 50%;

Malin (215) tras almacenamiento a 4-10°C durante 24-48h.

También ha sido descrita la estabilidad de  $M_1$  en mantequilla (10) y margarina (400), en ambas tras 1 mes de refrigeración.

En cuanto a las aflatoxinas  $B_1$  y  $G_1$ , el periodo máximo de almacenamiento a que se ha descrito estabilidad es tras 6 meses en mantequilla asada de cacahuete (388), y 2 años en harina y mantequilla de cacahuete (25).

Las diferencias encontradas entre lote 1 y 2, fundamentalmente en la influencia del almacenamiento en refrigeración, como ya hemos indicado antes, pueden ser atribuibles a la no distinción entre porción interna y externa en el caso del lote 2.

#### IV.7.g. Influencia del almacenamiento en congelación sobre las aflatoxinas presentes en queso Madurado

Tanto para lote 1 como para lote 2, de los resultados obtenidos se puede deducir la estabilidad de las aflatoxinas durante el almacenamiento del queso en congelación, con recuperaciones iguales o ligeramente superiores al 100% tras 60 y 90 días.

Las oscilaciones en la recuperación pueden ser achacadas a los fenómenos producidos durante el proceso de descongelación lenta. Quizá puedan parecer un poco elevadas las

recuperaciones obtenidas para aflatoxinas G y M<sub>1</sub> en el lote 1, y para G<sub>1</sub> y M en el lote 2.

Estos resultados, que muestran la estabilidad de las aflatoxinas en queso congelado, los consideramos de gran interés, más que por tratarse de un proceso industrial normal del queso, por cuanto que en muchos laboratorios de análisis de micotoxinas es norma usual el congelado de las muestras para poder ir procesándolas a lo largo de un tiempo (180).

Nuestros resultados coinciden con los de otros autores. Así, Stoloff et al. (350) no encontraron una disminución significativa en M<sub>1</sub> tras 68 días de mantenimiento de leche naturalmente contaminada en congelación; a los 100 y 120 días describen pérdidas del 25 y 45 % respectivamente.

Kiermeier y Mashaley (180) encontraron estabilidad de B<sub>1</sub>, M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub> en leche tras 90 días a -32°C.

Wiseman y Marth (401) describen estabilidad en dos tipos de queso: Blanco y Bakers, tras 2 meses en congelación.

Dentro de otros productos lácteos, se ha descrito esta estabilidad en helado tras 8 meses en congelación (402). Estos mismos autores describen un incremento en M<sub>1</sub> durante la fabricación de granizado.

Wiseman y Marth (400) describen que M<sub>1</sub> permanece estable durante 2 meses en margarina.

## V. CONCLUSIONES

#### PRIMERA

De la extensa revisión bibliográfica del tema objeto de la presente Tesis Doctoral se infiere la necesidad de realizar aportaciones que aclaren diversos puntos oscuros referentes a la formación de aflatoxinas en los derivados lácteos fermentados (yogur, queso), existiendo independientemente de los aspectos básicos de la investigación importantes cuestiones de orden aplicativo en relación con la problemática sanitaria y de control alimentario.

#### SEGUNDA

La presencia de aflatoxinas en la fase acuosa de los derivados lácteos está influida por el pH, y resulta favorecida por la alcalinidad.

Basándonos en este hecho hemos llevado a cabo la descripción de una Técnica de análisis de aflatoxinas en leche y productos lácteos con muy aceptables características de sensibilidad y recuperación, así como economía y rapidez.

### TERCERA

El análisis de muestras de leche comercial procedentes de la zona Norte de España mostró un moderado contenido en aflatoxina M<sub>1</sub> en las mismas, sin una clara distribución estacional de las muestras positivas. Dos de las muestras analizadas sobrepasaron el límite legislativo vigente en Suiza (0.05 ppb), país ejemplo de control alimentario.

### CUARTA

El yogur constituye un buen sustrato para la producción de aflatoxinas, aunque el desarrollo de la cepa aflatoxicogénica por lo general ocasiona una alteración del mismo, que alertaría al consumidor de los riesgos de su ingestión. Sin embargo, eventualmente las alteraciones organolépticas pueden resultar inaparentes.

#### QUINTA

Si el sellado del yogur se produce 18 horas después de la contaminación con la cepa aflatoxicogénica, o la tapa sufre una alteración que permita la aireación del producto, se produce crecimiento del hongo y consiguiente producción de aflatoxinas. En ningún caso hubo producción de aflatoxinas cuando el yogur se almacenó a temperatura inferior a 10°C.

#### SEXTA

A lo largo de los estudios de producción de aflatoxinas sobre yogur no se ha encontrado relación entre el peso de micelio seco y la cantidad de toxina producida.



#### SEPTIMA

El crecimiento y producción de aflatoxinas por parte de A. parasiticus NRRL 2999 se acompaña de la difusión de una pigmentación amarillenta, fluorescente a la luz ultravioleta, en el substrato sobre el que se desarrolla, tanto en yogur como en queso Madurado, siendo la pigmentación y fluorescencia más intensas cuanto mayor es la producción de aflatoxinas.

#### OCIAVA

La posibilidad de producción de aflatoxinas en queso Madurado entero a 15 °C únicamente es posible cuando no se encuentra parafinado y cuando además es salado en salmuera estéril para evitar el crecimiento competitivo. Para la producción de altos niveles se precisan temperaturas más elevadas. Debe tenerse en cuenta el papel defensivo de la corteza del queso frente al desarrollo de hongos aflatoxicogénicos.

#### NOVENA

En los resultados obtenidos sobre producción de aflatoxinas en queso Madurado en ningún caso se detectó producción de aflatoxinas en el interior del queso, aunque sí se apreció en algunos casos difusión de toxinas a partir de la capa superficial, no superando en ningún caso los 20 mm.

#### DECIMA

A la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir la estabilidad de la aflatoxina M<sub>1</sub> durante el periodo de elaboración y almacenamiento del yogur.

#### UNDECIMA

Durante el proceso de elaboración del queso Madurado, todas las aflatoxinas estudiadas ( $E_1$ ,  $E_2$ ,  $G_1$ ,  $G_2$ ,  $M_1$ ), aparecen en mayor proporción en suero que en cuajada (en cantidades absolutas). Sin embargo, en relación proporcional al peso, las mayores cantidades de aflatoxinas fueron detectadas en cuajada.

#### DUODECIMA

A pesar de pequeñas oscilaciones, se puede afirmar la estabilidad de las aflatoxinas durante el periodo de madurado, refrigeración y congelación del queso Madurado.

## VI. BIBLIOGRAFIA

- 1.- ABDOLLAHI, A. (1981) Regulation of aflatoxin biosynthesis: Induction of aflatoxin production by various carbohydrates. J. Food Sci. , 46: 633-635.
- 2.- ABDOLLAHI, A. y R.L. BUCHANAN (1981) Regulation of aflatoxin biosynthesis: characterization of glucose as an apparent inducer of aflatoxin production. J. Food Sci. , 46: 143-146.
- 3.- AGNIHOTRI, V.P. (1964) Studies on Aspergilli. XVI. Effect of pH, temperature and carbon and nitrogen interaction. Mycopathol. Mycol. Appl. , 24: 305-314.
- 4.- ALDERMANN, G.G., C.O. EMEH y E.H. MARTH (1973) Aflatoxin and rubratoxin produced by Aspergillus parasiticus and Penicillium rubrum when grown independently, associatively, or with Penicillium italicum or Lactobacillus plantarum . Z. Lebensm. Unters. Forsch. , 153: 305-311.
- 5.- ALPERT, M.E., M.S.R. HUTT, G.N. WOGAN y C.S. DAVIDSON (1971) Association between aflatoxin content of food and hepatoma frequency in Uganda. Cancer Res. , 28: 253.
- 6.- ALLCROFT, R. y R.B.A. CARNAGHAN (1961) The toxicity of certain groundnut meals for poultry with special reference to their effect on ducklings and chickens. Vet. Record , 73: 1215.

- 7.- ALLCROFT, R. y R.B.A.CARNAGHAN (1963) Groundnut toxicity:  
An examination for toxin in human food products from  
animals fed toxic groundnut meal. Vet. Record , 75:  
259-263.
- 8.- ALLCROFT, R., R.A.ROBERTS y M.K.LLOYD (1968) Excretion of  
aflatoxin in a lactating cow. Food Cosmet.Toxicol. ,  
6: 619-625.
- 9.- ANADON, A. y M.CARRALLO (1983) Contaminación de granos de  
trigo y maíz almacenados por especies de Aspergillus  
y Penicillium . V Jornadas Toxicológicas. Madrid.
- 10.- APPLEBAUM, R.S., R.E.BRACKETT, D.W.WISEMAN y E.H.MARTH  
(1981) Aflatoxin in milk and milk products. Food  
Research Institute. Annual Report.
- 11.- APPLEBAUM, R.S., R.E.BRACKETT, D.W.WISEMAN y E.H.MARTH  
(1982) Aflatoxin: Toxicity to dairy cattle and  
occurrence in milk and milk products. A review. J.Food  
Ecol. , 45: 752-777.
- 12.- APPLEBAUM, R.S., R.E.BRACKETT, D.W.WISEMAN y E.H.MARTH  
(1982) Responses of dairy cows to dietary aflatoxin:  
Feed intake and yield, toxin content and quality of  
milk of cows treated with pure and impure aflatoxin.  
J.Dairy Sci. , 65: 1503-1508.

- 13.- APPLEBAUM, R.S. y E.H. MARTH (1982) Fate of aflatoxin M<sub>1</sub> in Cottage cheese. J. Food Prot. , 45: 903-904.
- 14.- APPLETON, B.S. (1985) Aflatoxin exposure and human liver-cancer risk. Food Chem. Toxic. , 23: 129.
- 15.- ASHWORTH, L.J. y J.L. McMEANS (1966) Association of Aspergillus \_\_\_\_ flavus and aflatoxins with a greenish-yellow fluorescence of cotton seed. J. Phytopathology , 56: 1104.
- 16.- ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (1980) Changes in methods: Aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and cheese (1).- official first action. J. Assoc. Offic. Anal. Chem. , 63: 394-395.
- 17.- AUSTWICK, P.K.C. 1984. Human mycotoxicosis.- past, present and future. Chem. Industry , 15: 547-551.
- 18.- AUSTWICK, P.K.C. y G. AYERST (1963) Toxic products in groundnuts. Groundnut microflora and toxicity. Chem. Industry , 2: 55-61.
- 19.- BANES, D. (1966) Food toxins of fungal origin: methodology and regulatory aspects. Food Technol. . 20: 755-756.

- 20.- BARTOS,J. y Z.MATYAS (1979) (Aflatoxin determination in cheeses). Veterinární Medicína , 24: 177-183.
- 21.- BARTOS,J. y Z.MATYAS (1980) (Occurrence of aflatoxins in fodders, raw materials and foods of animal origin). Ceskoslovenská Hygiena , 25: 346-350.
- 22.- BARTOS,J. y Z.MATYAS (1981) (Aflatoxin M<sub>1</sub> in raw milk). Veterinární Medicína , 26: 419-423.
- 23.- BASAPPA,S.C., A.JAYARAMAN, V.SREENIVASAMURTHY y H.A.B.PARPIA (1967) Effect of B-group vitamins and ethyl alcohol on aflatoxin production by Aspergillus oryzae . Indian J.Exptl.Biol. , 5: 262-263.
- 24.- BASSIR,O. y A.A.ADEKUNLE (1972) Production of aflatoxin B<sub>1</sub> from defined natural cultures of Aspergillus flavus Link. Mycopathol.Mycol.Appl. , 46: 241-246.
- 25.- BAUR,F.J. (1975) Effect of storage upon aflatoxin levels in peanut materials. J.Amer.Oil.Chem.Soc. , 52: 263.
- 26.- BEEBE,R.M. y D.M.TAKAHASHI (1980) Determination of aflatoxin M<sub>1</sub> by high pressure liquid chromatography using fluorescence detection. J.Agric.Food.Chem. , 28: 481-482.
- 27.- BENNET,J.W. y S.B.CHRISTENSEN (1983) New perspectives on



- aflatoxin biosynthesis. Adv.Appl.Microbiol. , 29: 53-92.
- 28.- BENNET,J.W., J.J.DUNN y C.I.GOLDSMAN (1981) Influence of white light on production of aflatoxins and anthraquinones in Aspergillus\_\_\_\_\_parasiticus . Appl.Environ.Microbiol. , 41: 488-491.
- 29.- BENNETT,J.W., R.B.SILVERSTEIN y S.J.KRUGER (1981) Isolation and characterization of two nonaflatoxigenic classes of morphological variants of Aspergillus parasiticus . J.Amer.Oil.Chem.Soc. , 58: 952A-955A.
- 30.- BIERMANN,A. y G.TERPLAN (1980) Nachweis von Aflatoxin B<sub>1</sub> mittels ELISA. Archiv.Lebensmittel. , 31: 51-57.
- 31.- BIERMANN,A. y G.TERPLAN (1982) Erfahrungen mit einem Mikro-ELISA zur Aflatoxin B<sub>1</sub> Bestimmung in lebensmitteln. Archiv.Lebensmittel. , 33: 17-20.
- 32.- BLANC,B., E.LAUBER y R.SIEBER (1983) Fixation de l'aflatoxine sur les proteines du lait. Microb.Alim.Nutr. , 1: 163-177.
- 33.- BLANC,M. (1979) Application de la chromatographie liquide haute performance avec detection spectrophotométrique, ultra-violette et fluorimétrique au dosage des aflatoxines. Ann.Fals.Exp.Chim. , 778:

427-440.

- 34.- BLANC, M. y A. KARLESKIND (1981) Données sur la contamination par l'aflatoxine M<sub>1</sub> du lait et des produits laitiers en France. Lait, 61: 481-493.
- 35.- BOLETIN OFICIAL DEL ESTADO de 5 de Enero de 1985. Orden de 21 de Diciembre de 1984. Reglamento de la Denominación de origen "Queso Manchego" y de su Consejo Regulador. pp 267-282.
- 36.- BOLETIN OFICIAL DEL ESTADO de 6 de Septiembre de 1976. Orden de 23 de Junio. Autorización y registro de las sustancias y productos que intervienen en la alimentación de los animales. pp 17.366-17.392.
- 37.- BONJEAN-LINCZOWSKI, Y. y F.M. LUQUET (1981) Les aflatoxines et les produits laitiers. Technique Laitière, 955: 33-35, 38.
- 38.- BOUTIBONNES, F., Y. AUFRAY, C. MALHERBE, W. KOGBO y C. MARAIS (1984) Propriétés antibactériennes et genotoxiques de 33 mycotoxines. Mycopathologia, 67: 43-49.
- 39.- BOUTRIF, E., M. JEMMALI, A. D. CAMPBELL y A. E. POHLAND (1977) Aflatoxin in Tunisian foods and foodstuffs. Ann. Nutr. Alim., 31: 431-434.

- 40.- BRACKETT,R.E., R.S.AFFLEBAUM, D.W.WISEMAN y E.H.MARTH (1982) Fate of aflatoxin M<sub>1</sub> in Brick and Limburger-like cheese. J.Food Prot. , 45: 553-556.
- 41.- BRACKETT,R.E. y E.H.MARTH (1982) Fate of aflatoxin M<sub>1</sub> in Cheddar cheese and in process cheese spread. J.Food Prot. , 45: 549-552.
- 42.- BRACKETT,R.E. y E.H.MARTH (1982) Association of aflatoxin M<sub>1</sub> with casein. Z.Lebensm.Unters.Forsch. , 174: 439-441.
- 43.- BRACKETT,R.E. y E.H.MARTH (1982) Fate of aflatoxin M<sub>1</sub> in Parmesan and Mozzarella cheese. J.Food Prot. , 45: 597-600.
- 44.- BREWINGTON,C.R., J.L.WEIHRAUCH y C.L.OGG (1970) Survey of commercial milk samples for aflatoxin M. J.Dairy Sci. , 53: 1509-1510.
- 45.- BREZINA,P., J.MRAZEK y J.LOHNISKY (1983) (Occurrence of aflatoxin in Edam-type cheeses). Prumysl.Potravin , 34: 413-415.
- 46.- BROWN,R.F., J.D.WILDMAN y R.M.EPPLEY (1968) Temperature-dose relationships with aflatoxin on the brine shrimp Artemia salina . J.Assoc.

Offic. Anal. Chem. , 51: 905-906.

- 47.- BUCHANAN, R.L. y J.C. AYRES (1975) Effects of initial pH on aflatoxin production. Appl. Microbiol. , 30: 1050-1051.
- 48.- BUCHANAN, R.L. y J.C. AYRES (1976) Effect of sodium acetate on growth and aflatoxin production by Aspergillus parasiticus NRRL 2999. J. Food Sci. , 41: 128-132.
- 49.- BULLERMAN, L.B. (1976) Incidence of mycotoxic molds in domestic and imported cheeses. Abstracts Annual Meeting ASM, 76: 190.
- 50.- BULLERMAN, L.B. (1976) Examination of Swiss cheese for incidence of mycotoxin producing molds. J. Food Sci. , 41: 26-28.
- 51.- BULLERMAN, L.B. (1977) Incidence and control of mycotoxin producing molds in domestic and imported cheeses. Ann. Nutr. Aliment. , 31: 435-446.
- 52.- BULLERMAN, L.B. (1979) Methods for detecting mycotoxins in foods and beverages. En "Food and Beverage Mycology". Ed. L.R. Beuchat, AVI PUBLISHING COMPANY, INC. WESTPORT, CONNECTICUT.

- 53.- BULLERMAN,L.B. (1979) Significance of mycotoxins to food safety and human health. J.Food Prot. , 42: 65-86.
- 54.- BULLERMAN,L.B. (1980) Incidence of mycotoxic molds in domestic and imported cheeses. J.Food Safety , 2: 47-58.
- 55.- BULLERMAN,L.B. (1981) Public health significance of molds and mycotoxins in fermented dairy products. J.Dairy Sci. , 64: 2439-2452.
- 56.- BULLERMAN,L.B. (1985) Interactive effects of temperature and pH on mycotoxin production. Lebensm.Wiss.Technol., 18: 197-200.
- 57.- BULLERMAN,L.B., F.A.HARTMAN y J.C.AYRES (1969) Aflatoxin production in meats. I.Stored meats. Appl.Microbiol. . 18: 714-717.
- 58.- BULLERMAN,L.B. y F.J.OLIVIGNI (1974) Mycotoxin producing potential of molds isolated from Cheddar cheese. J.Food Sci. , 39: 1166-1168.
- 59.- BULLERMAN,L.B., L.L.SCHROEDER y K.Y.FARK (1984) Formation and control of mycotoxins in food. J.Food Egt. , 47: 637-646.
- 60.- BURDASPAL,F.A., T.M.LEGARDA e I.FINILLA (1987)

Incidencia de la contaminación por aflatoxina M<sub>1</sub> en leche. Rev.Agroquim.Tecnol.Aliment. , 23: 287-290.

- 61.- BURDASPAL,P.A. e I.PINILLA (1981) Estudio sobre la contaminación por micotoxinas en alimentos infantiles. Actas VIII Congreso Nacional de Microbiología. Madrid.
- 62.- BURMEISTER,H.R. y C.W.HESSELTINE (1966) Survey of the sensivity of microorganisms to aflatoxin. Appl.Microbiol. , 14: 403-404.
- 63.- BURZYNSKA,H. (1977) Possible production of aflatoxin B<sub>1</sub> in mayonnaise and Cottage cheese. Zesz.Probl. Post.Roln. , 189: 83-.
- 64.- BUTLER,W.H. (1973) Review of the toxicology of aflatoxin. Pure.Appl.Chem. , 35: 217-222.
- 65.- BUTLER,W.H. y G.E.NEAL (1977) Mode of action and human health aspects of aflatoxin carcinogenesis. Ann.Nutr.Alim. , 31: 949-956.
- 66.- CABO,F.V. (1980) Survey on the levels of contamination by aflatoxin in Mozambique's basic foodstuffs. Proceedings I World Congress Foodborne Infections and Intoxications. Berlin. pp 668-679.
- 67.- CALVO,M.A., F.J.CABANES, L.ABARCA y T.BRUGUERA (1984)

Capacidad toxicogénica de cepas fúngicas aisladas del foie-gras. IV Reunión científica Grupo de Microbiología de los Alimentos de la S.E.M. Pamplona

- 68.- CALVO, M.A., J. GUARRO y M. BARAU (1979) Contribución al estudio de la micoflora presente en quesos españoles. Actas VII Congreso Nacional Microbiología. Cádiz
- 69.- CAMPBELL, T.C. y L. STOLOFF (1974) Implication of mycotoxins for human health. J. Agr. Food Chem., 22: 1006-1015.
- 70.- CARINI, S. y G. CERUTTI (1977) Sulla presenza di muffe e micotossine in formaggi italiani. Industrie Alimentari, 16: 106-108.
- 71.- CASTELLI, S. y A. RIBERZANI (1981) Aflatossina M<sub>1</sub> nel latte e derivati. Aspetti Igienico-Sanitari e problemi analitici. Atti Soc. Ital. Sci. Veter., 35: 671-672.
- 72.- DIEGLER, A. y E. B. LILLEHOJ (1968) Mycotoxins. Adv. App. Microbiol., 10: 155-219.
- 73.- DIEGLER, A., R. F. PETERSON, A. A. LAGODA y H. H. HALL (1966) Aflatoxin production and degradation by Aspergillus flavus in 20-litre fermentors. Appl. Microbiol., 14: 826-833.

- 74.- CLEMENTS,N.L. (1968) Rapid confirmatory test for aflatoxin B<sub>1</sub> , using Bacillus megaterium . J.Assoc. Offic.Anal.Chem. , 51: 1192-1194.
- 75.- CLEVSTROM,G., H.L.JUNGGREN, S.TEGELSTROM y K.TIDEMAN (1983) Production of aflatoxin by an Aspergillus flavus isolate cultured under a limited oxygen supply. Appl.Environ.Microbiol. , 46: 400-405.
- 76.- COALLIER-ASCAH,J. y E.S.IDZIAK (1985) Interaction between Streptococcus lactis and Aspergillus flavus on production of aflatoxin. Appl.Environ.Microbiol. , 49: 163-167.
- 77.- COHEN,H., M.LAFOINTE y J.M.FREMY (1984) Determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk by liquid chromatography with fluorescence detection. J.Assoc.Offic.Anal.Chem. , 67: 49-51.
- 78.- COOKE,W.B. y A.R.BRAZIS (1968) Occurrence of molds and yeasts in dairy products. Mycopathol.Mycol.Appl. , 35: 281-289.
- 79.- COPPEDGE,R.L. (1983) Aflatoxin Control in Arizona. Food Research Institute. Annual Spring Meeting.
- 80.- CORBION,B. y J.M.FREMY (1978) Recherche des aflatoxines B<sub>1</sub> et M<sub>1</sub> dans les fromages de type Camembert. Lait .



- 57: 133-140.
- 81.- COULTER, J.B.S., S.M.LAMPLUGH, G.I.SULIMAN, M.I.A.OMER y R.G.HENDRICKSE (1984) Aflatoxins in human breast milk. Annals Trop. Paed., 4: 61-66.
- 82.- CUTULI, M.T. (1983) Investigación en torno a la micoflora y presencia de aflatoxinas en harinas y productos derivados destinados al consumo humano. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense. Madrid.
- 83.- CUTULI, M.T. y G.SUAREZ (1984) Determination of aflatoxins in bread and bakery products. J. Food Prot., 47: 627-628.
- 84.- CZERWIECKI, L. (1983) (Determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk). Boczn. Paust. Zakl. Hig., 34: 277-280.
- 85.- CHU, F.S. (1984) Immunoassays for analysis of mycotoxins. J. Food Prot., 47: 562-569.
- 86.- CHU, F.S., W.BISCHOFF, T.S.FAN, J.M.FREMY, M.T.LIANG, J.DLSON, S.SCHUBRING, R.D.WEI, N.WOYCHIK y G.S.ZHANG (1984) Immunochemical studies on mycotoxins. Food Research Institute. Annual Report, pp 422-424.
- 87.- DAVIS, N.D. y U.L.DIENER (1979) Mycotoxins. En "Food and

Beverage Mycology". Ed.L.R.Beuchat. AVI PUBLISHING COMPANY, INC. WESTPORT, CONNECTICUT. pp 397-444.

- 88.- DAVIS,N.D., U.L.DIENER y D.W.ELDRIDGE (1966) Production of aflatoxins B<sub>1</sub> and G<sub>1</sub> by Aspergillus flavus in a semisynthetic medium. Appl.Microbiol. , 14: 378-380.
- 89.- DELLA ROSA,H.V. y E.C.F.MORAES (1981) Determinação de residuo de AFM<sub>1</sub> em leite por fluordensitometria. Rev.Farm.Bioquim.Univ.S.Paulo , 17: 270.
- 90.- DEMIRER,M.A. (1973) (Research on the determination of aflatoxins M<sub>1</sub> and B<sub>1</sub> in liquid milk and dairy products). Veter.Fakul.Dergis.Ankara Univ. , 20: 421-443.
- 91.- DEPARTAMENT FEDERAL DE L'INTERIEUR (1981) Ordonnance sur les exigences hygiéniques et microbiologiques relatives aux denrées alimentaires, objets usuels et biens de consommation No 817.024.
- 92.- DEVROYD,J.J. (1977) Micotossine e formaggi. Industria Alimentari , 16: 112-114.
- 93.- DIENER,U.L. y N.D.DAVIS (1966) Aflatoxin production by isolates of Aspergillus flavus . Phytopathology , 56: 1390-1393.

- 94.- DIENER,U.L. y N.D.DAVIS (1967) Limiting temperature and relative humidity for growth and production of aflatoxin and free fatty acids by Aspergillus flavus in sterile peanuts. J.Amer.Oil Chem.Soc. , 44: 259-263.
- 95.- DIENER,U.L. y N.D.DAVIS (1969) Aflatoxin formation by Aspergillus flavus . En "Aflatoxin, scientific background, control and implications" Ed.L.A.Goldblatt. ACADEMIC PRESS. NEW YORK. pp 13-54.
- 96.- DONCHEVA,I. y N.BONCHEV (1978) (Aflatoxine in milk and milk products). Khigiena i Zdraveopazivane , 21: 483-489.
- 97.- DULLEY,J.R. y D.B.HOULIHAN (1979) An examination of Queensland milk and cheese for possible aflatoxin contamination. Australian J.Dairy Technol. , 34: 12-13.
- 98.- DZUREC,D.J. y R.R.ZALL (1985) Effect of heating, cooling and storing milk on casein and whey proteins. J.Dairy Sci. . 68: 273-280.
- 99.- EECKHOUTTE,M. (1979) Moisissures et denrées alimentaires d'origine animale. Revue Med.Vet. , 130: 943-971.
- 100.- EL-ESSAWY,H.A., A.M.SAUDI, S.MAHMOUD y S.D.MORGAN

(1984) Fungal contamination of hard cheese. Assiut Vet. Med. J. , 11: 125-129.

- 101.- EL-GENDY, S.M. y E.H. MARTH (1980) Growth of toxigenic and nontoxigenic aspergilli and penicillia at different temperatures and in the presence of lactic acid bacteria. Archiv. Lebensm. , 31: 192-195.
- 102.- EL-GENDY, S.M. y E.H. MARTH (1980) Proteolytic and lipolytic activities of some toxigenic and nontoxigenic aspergilli and penicillia. J. Food Prot. , 43: 354-355.
- 103.- EL-GENDY, S.M. y E.H. MARTH (1981) Growth and aflatoxin production by Aspergillus parasiticus in the presence of Lactobacillus casei . J. Food Prot. , 44: 211-212.
- 104.- ENGEL, G. (1978) Bildung von Mykotoxinen auf Tilsiter Käse. Milchwissenschaft , 33: 201-203.
- 105.- ENGEL, G. y H. HAGEMEISTER (1978) Untersuchungen über den Verbleib von AFB<sub>1</sub> in Verdauungstrakt von Kühen. Milchwissenschaft , 33: 21-23.
- 106.- FAO, OMS, PNUMA (1977) Micotoxinas. Estudio FAO: alimentación y nutrición no 2. Roma.
- 107.- FEHR, P.M., L. BERNAGE y V. VASSILOPOULOS (1968) Effet de la consommation de tarteau d'arachide pollué par

Aspergillus flavus chez le ruminant en lactation.  
Lait , 48: 377.

108.- FERNANDEZ, J.A. (1985) Denominación de origen del "queso Manchego". España Ganadera , 128: 38-39.

109.- FERRANDO, R., M. PALISSE-ROUSSEL y L. JACQUOT (1984)  
Toxicité de relais de l'aflatoxine M<sub>1</sub> de la poudre de  
lait. Etude à moyen terme sur le caneton.  
C.R. Acad. Sci. Paris, Serie III , 298: 355-358.

110.- FINDLI, C., A. VECCHIO, M. BELLAVITA y G. CERUTTI (1983)  
Sulla presenza di aflatossina M<sub>1</sub> in latte e derivati.  
Latte , 8: 611-625.

111.- FISCHBACH, H. y A. D. CAMPBELL (1965) Note on  
detoxification of the aflatoxins. J. Assoc.  
Offic. Anal. Chem. , 48: 28.

112.- FOUCHE, H. y C. PESTRE (1984) Contamination de l'arachide  
par Aspergillus flavus . Aspects toxicologiques et  
implications sanitaires et économiques pour le Sénégal  
(Sénégalie). Risques toxiques pour le consommateur  
résultant de la présence éventuelle d'aflatoxines dans  
les produits laitiers. Th. Pharmacie. Paris 11. 299 pp.

113.- FRANK, H.K. (1968) Diffusion of aflatoxin in foodstuffs.  
J. Food Sci. , 33: 98-100.

- 114.- FRANK, H.K. y W.EYRICH (1969) Ueber den Nachweis von Aflatoxinen und das Vorkommen Aflatoxin-vortauschender Substanzen in Lebensmitteln. Z. Lebens. Unters. Forsch. , 138: 1-11.
- 115.- FRAYSSINET, C. y M.JEMMALI (1976) Réglementation de la teneur en aflatoxine dans les aliments destinés à la consommation humaine. Méd. Nutr. , 12: 320-325.
- 116.- FREMY, J.M. y B.BOURSIER (1981) Rapid determination of aflatoxin  $M_1$  in dairy products by reversed-phase high performance liquid chromatography. J. Chromatography , 219: 156-161.
- 117.- FREMY, J.M., T.CARIOU y C.BONNET. Natural occurrence of aflatoxin  $M_1$  in milk and whey powders in France. V Int.IUPAC Symposium. Viena.
- 118.- FREMY, J.M., T.CARIOU y C.TERRIER (1981) Evaluation de la contamination en aflatoxine  $M_1$  dans le lait en poudre par HPLC en phase inversée. Ann. Fals. Exp. Chim. , 74: 547-554.
- 119.- FREMY, J.M. y F.S.CHU (1984) Direct enzyme-linked immunosorbent assay for determining aflatoxin  $M_1$  at picogram levels in dairy products. J. Assoc. Offic. Anal. Chem. , 67: 1098-1101.

- 120.- FREMY,J.M. y A.GAYMARD (1980) Recherche d'aflatoxine M<sub>1</sub> dans les poudres de lactosérum. Evaluation saisonnière de la contamination. Lait , 60: 635-644.
- 121.- FREMY,J.M. y P.QUILLARDET (1985) The "carry-over" of aflatoxin into milk of cows fed ammoniated rations: use of an HPLC method and a genotoxicity test for determining milk safety. Food Add.Cont. , 2: 201-207.
- 122.- FREMY,J.M. y J.C.ROILAND (1979) Devenir de l'aflatoxine M<sub>1</sub> au cours de la fabrication du fromage de type Camembert. Ann.Nutr.Alim. , 33: 619-630.
- 123.- FRITZ,W., R.DONATH y R.ENGST (1977) Bestimmung und Vorkommen von Aflatoxin M<sub>1</sub> und B<sub>1</sub> in Milch und Milchprodukten. Die Nahrung , 21: 79-84.
- 124.- FRITZ,W. y R.ENGST (1981) Survey of selected mycotoxins in food. J.Environ.Sci.Health , 16: 193.
- 125.- GAJEK,D. (1982) (Aflatoxins in protein food for animals and milk). Reczn.Paust.Zehl.Hig. , 33: 415-420.
- 126.- GAUCH,R., V.LEVENBERGER y E.BAUMGARTNER (1979) Rapid and simple determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk in the low parts per 10<sup>12</sup> range. J.Chromatography , 178: 543-549.

- 127.- GILBERT,J., M.J.SHEPHERD, M.A.WALLWORK y M.E.KNOWLES  
(1984) A survey of the occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in  
UK-produced milk for the period 1981-1983. Food  
Addit.Cont. , 1: 23-28.
- 128.- GIMENO,A. (1979) Thin layer chromatographic  
determination of aflatoxins, ochratoxins,  
sterigmatocystin, zearalenone, citrinin, T-2 toxin,  
diacetoxyscirpenol, penicillic acid, patulin and  
penitrem A. J.Assoc.Offic.Anal.Chem. , 62: 579-585.
- 129.- GOLDBLATT,L.A. (1969) Aflatoxin. Scientific background,  
control and implications. ACADEMIC PRESS. NEW YORK.
- 130.- GOLDBLATT,L.A. (1973) Learning to live with mycotoxins:  
aflatoxin- a case history. Pure\_\_Appl.Chem. , 35:  
223-238.
- 131.- GOMEZ-LUCIA,E. (1985) Síntesis de enterotoxinas  
estafilocócicas en alimentos tipo de elevado consumo.  
Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad  
Complutense. Madrid.
- 132.- GRANT,D.W. y F.W.CARLSON (1971) Partitioning behavior  
of aflatoxin M<sub>1</sub> in dairy products. Bull.Environ.  
Contam.Toxicol. , 6: 521-524.



- 133.- GUERGUE,J. y C.RAMIREZ (1977) Incidence of aflatoxin potential contamination in Spanish sausages. Ann.Nutr.Alim. , 31: 485-488.
- 134.- GUPTA,S.R., L.VISWANATHAN y T.A.VENKITASUBRAMANIAN (1971) A comparative study of toxigenic and non-toxicogenic strains of Aspergillus\_\_flavus . J.Gen.Microbiol. , 65: 243-247.
- 135.- HAMILTON,P.B. (1984) Determining safe levels of mycotoxins. J.Food.Prot. , 47: 570-575.
- 136.- HANSSEN,E. y M.JUNG (1973) Control of aflatoxins in the food industry. Pure.Appl.Microbiol. , 35: 239-250.
- 137.- HARA,S., D.I.FENNELL y C.W.HESSELTINE (1974) Aflatoxin producing strains of Aspergillus.flavus detected by fluorescence of agar medium under ultraviolet light. Appl.Microbiol. , 27: 1118-1123.
- 138.- HAYES,A.W., N.D.DAVIS y U.L.DIENER (1966) Effect of aeration on growth and aflatoxin production by Aspergillus\_\_flavus in submerged culture. Appl. Microbiol. , 14: 1019-1021.
- 139.- HAYES,R.B., J.F.VAN NIEUWENHUIZE, J.W.RAATGEVER y F.J.W.TEN KATE (1984) Aflatoxin exposures in the industrial setting: an epidemiological study of

mortality. Food Chem. Toxicol. , 22: 39-43.

- 140.- HEESCHEN, W., A. BLUTHGEN, A. TOLLE y G. ENGEL (1981)  
Untersuchungen zum Vorkommen von Aflatoxin M<sub>1</sub> in Milch  
und Milchpulver in der Bundesrepublik Deutschland.  
Milchwissenschaft , 36: 1-4.
- 141.- HEESCHEN, W., H. NIJHUIS y A. BLUTHGEN (1983) Aflatoxin M<sub>1</sub>.  
Bildung, Analytik, Carry over aus Futtermitteln und  
Situation in der Milch. Deutsche Molkerei Zeitung ,  
104: 1434, 1437-1440.
- 142.- HESSELTINE, C. W., O. L. SHOTWELL, J. J. ELLIS y  
R. D. STUBBLEFIELD (1966) Aflatoxin formation by  
Aspergillus flavus . Bacteriol. Rev. , 30: 795-805.
- 143.- HISADA, K., K. YAMAMOTO, H. TSUBOUCHI y Y. SAKABE (1984)  
(Natural occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in imported and  
domestic cheese). J. Food Hyg. Soc. Japan , 25: 543-548.
- 144.- HODGES, F. A., J. R. ZUST, H. R. SMITH, A. A. NELSON,  
B. H. ARMBRECHT y A. D. CAMPBELL (1964) Mycotoxins:  
aflatoxin isolated from Penicillium puberulum .  
Science , 145: 1439.
- 145.- HOLMQUIST, G. U., H. W. WALKER y H. M. STAHR (1983) Influence  
of temperature, pH, water activity and antifungal  
agents on growth of Aspergillus flavus and

A.parasiticus . J.Food\_Sci. , 48: 77B-782.

146.- HOLZAPFEL,C.W., P.S.STEYN e I.F.H.PURCHASE (1966)  
Isolation and structure of aflatoxins M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub>.  
Tetrahedron\_Letters , 25: 2799.

147.- HORN,B.W. y D.T.WICKLOW (1983) Factors influencing the  
inhibition of aflatoxin production in corn by  
Aspergillus\_niger . Can.J.Microbiol. , 29: 1087-1091.

148.- HUYNH,V.L. y A.B.LLOYD (1984) Synthesis and degradation  
of aflatoxins by Aspergillus\_parasiticus . I.Synthesis  
of aflatoxin B<sub>1</sub> by young mycelium and its subsequent  
degradation in aging mycelium. Austr.J.Biol.Sci. , 37:  
37-43.

149.- JACOBSON,W.C., W.C.HARMEYER y H.G.WISEMAN (1971)  
Determination of aflatoxins B<sub>1</sub> and M<sub>1</sub> in milk. J.Dairy  
Sci. , 54: 21-24.

150.- JACQUET,J., P.BOUTIBONNES y A.TEHERANI (1970) Sur la  
présence des flavatoxines dans les aliments des animaux  
et dans les aliments d'origine animale destinés à  
l'homme. Bull.Acad.Vet. , 43: 35-43.

151.- JACQUET,J., P.BOUTIBONNES y A.TEHERANI (1971) Recherche  
des flavacoumarines par chromatographie en couche  
mince. Importance de la discrimination des autres

taches fluorescentes. Bull.Acad.Vet. , 43: 263-275.

- 152.- JACQUET,J., J.LAFONT y P.LAFONT (1982) Sur la contamination du lait par les aflatoxines M. Revue Laitiere.Fr. , 412: 64-67.
- 153.- JACQUET,J. y A.TANTADUI-ELARAKI (1976) Les produits laitiers comme milieux de culture et de toxicogénèse des Aspergillus du groupe flavus . Cas particulier des fromages. C.R.Seances\_Acad.Agric.Fr. , 62: 208-217.
- 154.- JACQUET,J. y A.TANTADUI-ELARAKI (1977) Sur la notion du pouvoir toxigène des souches d' Aspergillus du groupe flavus . Ann.Nutr.Alim. , 31: 563-574.
- 155.- JACQUET,J. y M.TEHERANI (1974) Présence exceptionnelle de l'aflatoxine dans certains produits d'origine animale. Rôle possible du poivre. Bull.Acad.Vet.Fr. , 47: 313-315.
- 156.- JARVIS,B. (1977) Methods for detecting fungi in foods and beverages. En "Food and beverage mycology". Ed.L.R.Beuchat. AVI PUBLISHING COMPANY, INC, WESTPORT, CONNECTICUT. pp 471-508.
- 157.- JARVIS,B. (1983) Moulds and mycotoxins in mouldy cheeses. Microb.Alim.Nutr. , 1: 187-191.

- 158.- JESENSKA,Z. (1983) Problems of aflatoxins, aflatoxicoses and aflatoxin producing strains in the conditions of Central Europe. Atti del Convegno Nazionale Sul Genere Aspergillus . ROTULA PUBLISHING HOUSE. BRESCIA.
- 159.- JESENSKA,Z. y O.POLAKOVA (1978) Zur problematik der potentiellen Mykotoxin produzenten in Milchpulvern für Kleinstkinder. Z.Lebensm.Unters.Forsch. , 166: 1-4.
- 160.- JESENSKA,Z., M.POLSTER y I.HRDINOVA (1983) (Mycoflora in dessicated milk during the years 1975-1980). Cs.Pediat. , 38: 236-238.
- 161.- JODRAL,M. (1977) Investigaciones sobre aflatoxinas: influencia de condiciones ambientales en la contaminación de piensos y presencia en leche natural y esterilizada. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba.
- 162.- JODRAL,M. (1979) Influencia de condiciones ambientales en la contaminación de piensos con Aspergillus flavus. Arch.Zootec. , 28: 351-357.
- 163.- JODRAL,M. (1980) Aflatoxinas en aceites vegetales. Rev.San.Hig.Publ. , 54: 765-771.

- 164.- JODRAL,M., G.ZURERA, R.JORDANO, L.M.POLO y R.POZO  
(1984) Investigación de aflatoxinas en leche natural,  
esterilizada y en polvo. Arch.Zootec. , 33: 189-198.
- 165.- JOFFE,A.Z. y N.LISKER (1969) Effects of light,  
temperature and pH values on aflatoxin production in  
vitro. Appl.Microbiol. , 18: 517-518.
- 166.- KANDEM,L. y G.PERCEFOIS (1980) Conditions de production  
d'aflatoxines et d'acide kojique par des souches d'  
Aspergillus et de Penicillium isolées du revêtement  
cutané humain. Bull.Acad.Soc.Lorr.Sci. , 19: 11-20.
- 167.- KARAIIDANNOGLOU,F. (1984) Aflatoxin production on white  
brined Feta cheese. Milchwissenschaft , 39: 671-674.
- 168.- KARIM,G., V.PARVANEH y J.KORDI (1982) Some  
investigations on the aflatoxin contamination of raw  
and pasteurized milk in Teheran area. XXI International  
Dairy Congress. Vol 1, Book 2. MIR.PUBLISHERS.
- 169.- KASDORF,W. (1966) Yoghurt: su origen, composición y  
valor dietético. EMECE EDITORES, S.A. BUENOS AIRES.
- 170.- KIERMEIER,F. (1970) Zum Nachweis von Aflatoxinen in  
Käse. Z.Lebensm.Unters.Forsch. , 144: 293-297.
- 171.- KIERMEIER,F. (1973) Aflatoxin residues in fluid milk.

Eure. Appl. Microbiol. , 35: 271-273.

- 172.- KIERMEIER, F. (1973) Über die Aflatoxin M Ausscheidung in Kuhmilch in Abhängigkeit von der aufgenommenen Aflatoxin B<sub>1</sub> Menge. Milchwissenschaft , 28: 683-685.
- 173.- KIERMEIER, F. y G. BEHRINGER (1972) Zur Aflatoxinbildung in Milch und Milchprodukten. Z. Lebensm. Unters. Forsch., 148: 72-76.
- 174.- KIERMEIER, F. y G. BEHRINGER (1977) Einfluss von Kühltemperaturen auf die Aflatoxin-Entwicklung bei Milchprodukten. Z. Lebensm. Unters. Forsch. , 164: 283-285.
- 175.- KIERMEIER, F. y G. BEHRINGER (1977) Probenahme bei Aflatoxin verdächtigen Käsen. Z. Lebensm. Unters. Forsch., 165: 30-33.
- 176.- KIERMEIER, F. y S. BOHM (1971) Zur Aflatoxinbildung in Milch und Milchprodukten. V. Anwendung des Hühnerembryo-Testes zur Sicherung des dunnschichtchromatographischen Aflatoxin Nachweises in Käsen. Z. Lebensm. Unters. Forsch. , 147: 61-64.
- 177.- KIERMEIER, F. y M. BUCHNER (1977) Zur Verteilung von Aflatoxin M<sub>1</sub> auf Molke und Bruch bei der Käseherstellung. Z. Lebensm. Unters. Forsch. , 164:

B2-B6.

- 178.- KIERMEIER, F. y M. BUCHNER (1977) Verhalten von Aflatoxin  $M_1$  während der Reifung und Lagerung von Käse. Z. Lebensm. Unters. Forsch. , 164: 87-91.
- 179.- KIERMEIER, F. y D. GRÖLL (1970) Zur Aflatoxin  $B_1$  Bildung in Käsen. Z. Lebensm. Unters. Forsch. , 143: 81-89.
- 180.- KIERMEIER, F. y R. MASHALEY (1977) Einfluss der molkereitechnischen Behandlung der Rohmilch auf den Aflatoxin  $M_1$  Gehalt der daraus hergestellten Produkte. Z. Lebensm. Unters. Forsch. , 164: 183-187.
- 181.- KIERMEIER, F. y W. MUCKE (1972) Über den Nachweis von Aflatoxin  $M_1$  in Milch. Z. Lebensm. Unters. Forsch. , 150: 137-140.
- 182.- KIERMEIER, F., V. REINHARDT y G. BEHRINGER (1975) Zum Vorkommen von Aflatoxinen in Rohmilch. Deut. Lebens. Rundschau , 71: 35-38.
- 183.- KIERMEIER, F. y S. RUMPF (1975) Über das Schicksal des Aflatoxins bei der Schmelzkäseherstellung. Z. Lebensm. Unters. Forsch. , 157: 211-216.
- 184.- KIERMEIER, F., G. WEISS, G. BEHRINGER y M. MILLER (1977) Über das Vorkommen und den Gehalt von Aflatoxin  $M_1$  in



- Käsen des Handels. Z. Lebensm. Unters. Forsch. , 163: 268-271.
- 185.- KIERMEIER, F., G. WEISS, G. BEHRINGER, M. MILLER y K. RANFFT (1977) Vorkommen und Gehalt an Aflatoxin M<sub>1</sub> in Molkerei Anlieferungsmilch. Z. Lebensm. Unters. Forsch. , 163: 171-174.
- 186.- KIERMEIER, F. y E. ZIERER (1975) Zur Wirkung von Pimaricin auf Schimmelpilze und deren Aflatoxinbildung bei Käsen. Z. Lebensm. Unters. Forsch. , 157: 253-262.
- 187.- KNUTTI, R., K. SUTTER y C. SCHLATTER (1979) Swiss Food , 1: 17.
- 188.- KOEHLER, F. E., L. R. BEUCHAT y M. S. CHINNAN (1985) Influence of temperature and water activity on aflatoxin production by Aspergillus flavus in Cowpea ( Vigna unguiculata ) seeds and meal. J. Food Prot. , 48: 1040-1043.
- 189.- KROGH, P. (1977) Mycotoxin tolerances in foodstuffs. Pure Appl. Chem. , 49: 1719-1721.
- 190.- KULIK, M. M. y C. E. HOLADAY (1966) Aflatoxin: a metabolic product of several fungi. Mycopathol. Mycol. Appl. , 30: 137-140.

- 191.- LABUZA, T.P. (1983) Regulation of mycotoxins in food.  
J. Food Prot. , 46: 260-265.
- 192.- LAFONT, P., J. LAFONT, S. MOUSSET y C. FRAYSSINET (1980)  
Etude de la contamination du lait de vache lors de  
l'ingestion de faibles quantités d'aflatoxine.  
Ann. Nutr. Alim. , 34: 699-708.
- 193.- LAFONT, P., M. SIRIWARDANA, J. JACQUET, M. GAILLARDIN y  
J. SARFATI (1981) Méthode de dosage de l'aflatoxine M<sub>1</sub>  
dans le lait et les produits laitiers. Lait , 61:  
275-281.
- 194.- LAFONT, P., M. G. SIRIWARDANA y J. LAFONT (1979)  
Contamination de fromages par des métabolites  
fongiques. Méd. Nutr. , 15: 257-262.
- 195.- LANDERS, K.E., N.D. DAVIS y U.L. DIENER (1967) Influence  
of atmospheric gases on aflatoxin production by  
Aspergillus flavus in peanuts. Phytopathology , 57:  
1086-1090.
- 196.- LEMIESZEK, K. (1974) (Detection and estimation of AFM  
in milk). Roczn. Państ. Zakł. Hig. , 25: 489-494.
- 197.- LEMIESZEK, K. (1977) Identification and semiquantitative  
determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk.  
Zesz. Probl. Post. Roln. , 189: 263-265.

- 198.- LIE, J.L. y E.H. MARTH (1967) Formation of aflatoxin in Cheddar cheese by Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus. J. Dairy Sci., 50: 1708-1710.
- 199.- LIE, J.L. y E.H. MARTH (1968) Aflatoxin formation by Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus in a casein substrate at different pH values. J. Dairy Sci., 51: 1743-1747.
- 200.- LIEU, F.Y. y L.B. BULLERMAN (1977) Production and stability of aflatoxins, penicillic acid and patulin in several substrates. J. Food Sci., 42: 1222-1224, 1228.
- 201.- LIJINSKY, W. y W.H. BUTLER (1966) Purification and toxicity of aflatoxin G<sub>1</sub>. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 123: 151-154.
- 202.- LIJINSKY, W., K.Y. LEE y C.H. GALLAGHER (1970) Interaction of aflatoxins B<sub>1</sub> and G<sub>1</sub> and tissues of the rat. Cancer Res., 30: 2280-2283.
- 203.- LIN, Y.C., J.C. AYRES y F.E. KOEHLER (1980) Influence of temperature cycling on the production of aflatoxins B and G by Aspergillus parasiticus. Appl. Environ. Microbiol., 40: 333-336.
- 204.- LOTZSCH, R. y L. LEISTNER (1977) Transmission of

aflatoxins into eggs and egg products. Ann.Nutr.Alim.,  
31: 499-508.

205.- LUCK,H., F.C.WEHNER, A.PLOMP y M.STEYN (1976)  
Mycotoxins in South African cheeses. S.Afr.J.Dairy  
Technol. , 8: 107-110.

206.- LYNCH,G.F. (1972) Mycotoxins in feedstuffs and their  
effect on dairy cattle. J.Dairy\_Sci. , 55: 1243-1255.

207.- LLEWELLYN,G.C., H.C.JONES, J.E.GATES y T.EADIE (1980)  
Aflatoxigenic potential for Aspergilli on sucrose  
substrate. J.Assoc.Offic.Anal.Chem. , 63: 622-625.

208.- MAFFEO,G., L.GAVAZZI, G.FERRARI y L.BIANCHI (1980)  
Determinazione e presenza dell'aflatossina M<sub>1</sub> nel latte  
di massa. Arch.Vet.Ital. , 31(suppl.1): 34-37.

209.- MAFFEO,G. y L.LEALI (1981) Osservazioni sperimentali  
sulla presenza di aflatossina M<sub>1</sub> nel latte del  
comprendorio milanese. Latte , 6: 601-603.

210.- MAHROUS,A.M., M.M.NAGUIB, K.NAGUIB, A.E.FOHLAND y  
A.D.CAMPBELL (1980) Aflatoxin residues in Egyptian  
foods. II.Milk and dairy products. Abstracts XII  
International Congress of Microbiology.

- 211.- MAING, I.Y., J.C. AYRES y P.E. KOEHLER (1973) Persistence of aflatoxin during fermentation of soy sauce. Appl. Microbiol. , 25: 1015-1017.
- 212.- MAJERUS, P. y R. WOLLER (1984) Dünnschichtchromatographie und hochdruckflüssigkeitschromatographie in der mykotoxinanalytik. Z. Lebensm. Unters. Forsch. , 178: 79-80.
- 213.- MALIN, T.P. (1983) Zum Vorkommen von Aflatoxin in Milch und Milchprodukten. Milchwirtschaftl. Berichte , 76: 201-205.
- 214.- MALINI, R., K.G. MUKERJI y T.A. VENKITASUBRAMANIAN (1983) Microbial interactions and aflatoxin production by Aspergillus flavus . Bibliotheca Mycologica , 91: 285-289.
- 215.- MANN, R. y H.J. REHM (1977) Degradation of aflatoxin B<sub>1</sub> by various microorganisms. Z. Lebensm. Unters. Forsch. , 163: 39-43.
- 216.- MARSHALY, R.I., S.A. EL-DEEB, A.A. ISMAIL y A. YOUSSEF (1981) Contamination of dairy products and cattle feed concentrates on the local market with aflatoxin. Egyptian J. Dairy Sci. , 9: 181-191.
- 217.- MARTH, E.H. (1979) Dairy products. En "Food and beverage

mycology". Ed.L.R.Beuchat. AVI PUBLISHING COMPANY, INC.  
WESTPORT, CONNECTICUT. pp 145-172.

218.- MARTLBAUER,E. y G.TERPLAN (1986) Development of enzyme immunoassays for analysis of mycotoxins. Proceedings 2nd World Congress Foodborne Infections and Intoxications. Berlin.

219.- MASIMANGO,N., J.L.RAMAUT y J.REMACLE (1977) Production de l'aflatoxine B<sub>1</sub> in vitro en fonction de diverses conditions de culture. Ann.Nutr.Alim. , 31: 583-605.

220.- MASRI,M.S., V.C.GARCIA y J.R.PAGE (1969) The aflatoxin M<sub>1</sub> content of milk from cows fed known amounts of aflatoxin. Vet.Record , 84: 146-147.

221.- MATELES,R.I. y J.C.ADYE (1965) Production of aflatoxins in submerged culture. Appl.Microbiol. 13: 208-211.

222.- MATEOS,A. (1982) Contribución al estudio de la micoflora contaminante del yogur. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense. Madrid.

223.- MATEOS,A., M.J.PAYA, M.T.CUTULI y G.SUAREZ (1982) Contribución al estudio de la micoflora contaminante del yogur. Aislamiento, comprobación e inoculación de especies aflatoxicogénicas. III Reunión Científica

Grupo Microbiología de los Alimentos. León.

- 224.- MATEOS, A. y G. SUAREZ (1984) Contaminating mycoflora in yogurt: general aspects and special reference to the genus Penicillium. J. Food Prot., 47: 629-636.
- 225.- MATEOS, A., G. SUAREZ y M. YLLA-CATALA (1979) Contribución al estudio de la micoflora contaminante del yogur. Actas VII Congreso Nacional de Microbiología. Cádiz.
- 226.- MATHUR, C.F., R.C. SMITH y G.E. HAWKINS (1976) Growth and morphology of Streptococcus bovis and of mixed rumen bacteria in the presence of aflatoxin B<sub>1</sub> in vitro. J. Dairy Sci., 59: 455-458.
- 227.- MCKINNEY, J.D. y G.C. CAVANAGH (1977) Extraction of "bound" aflatoxin. Zesz. Probl. Post. Nauk. Roln., 189: 247-253.
- 228.- MCKINNEY, J.D., G.D. CAVANAGH, J.T. BELL, A.S. HOVERSLUND, D.M. NELSON, J. PEARSON y R.J. SELKIRK (1973) Effects of ammoniation of aflatoxins in ration fed lactating cows. J. Amer. Oil Chem. Soc., 50: 79-84.
- 229.- McMEANS, J.L. (1981) Tolerance to in vitro accumulation of aflatoxins in pecan meal as affected by factors associated with yield ( Carya illinoensis Wangerh K. Koch). J. Amer. Oil Chem. Soc., 58: 983A-985A.

- 230.- MEDINA,M., P.GAYA y M.NÚÑEZ (1984) Micotoxinas en queso. I.Aflatoxina M<sub>1</sub> y metabolitos producidos por mohos contaminantes durante la maduración. Rev.Esp.Lech. , 132: 123-132.
- 231.- MEGALLA,S.E. y A.H.HAFEZ (1982) Detoxification of aflatoxin B<sub>1</sub> by acidogenous yoghurt. Mycopathologia , 77: 89-91.
- 232.- MIHAI,M.D., A.TURBURI y M.TAGA (1970) The presence of aflatoxigenic fungi in cheese and their capacity to synthesize aflatoxins. Archiva\_Vet. , 6: 113-118.
- 233.- MISLIVED,P.B., C.T.DIETER y V.R.BRUCE (1975) Effect of temperature and relative humidity on spore germination of mycotoxic species of Aspergillus and Penicillium. Mycologia , 67: 1187-1189.
- 234.- MOHRAN,M.A., S.E.MEGALLA y M.R.SAID (1984) Effect of aflatoxin B<sub>1</sub> on the proteolytic activity of some lactic acid bacteria. Mycopathologia , 86: 99-101.
- 235.- MOHRAN,M.A., S.E.MEGALLA y M.R.SAID (1985) The effect of aflatoxin B<sub>1</sub> on the activity of some lactic acid bacteria. Egyptian\_J.Dairy\_Sci. , 13: 25-32.
- 236.- MOLLER,T. y S.ANDERSSON (1983) (aflatoxin M<sub>1</sub> in milk).



Var\_Foda , 35: 461-465.

- 237.- MOREAU,C. (1976) Les mycotoxines dans les produits laitiers. Lait , 55: 286-303.
- 238.- MOREAU,C. (1984) Vingt ans de mycotoxines en France. Dossiers de l'élevage , 5: 5-20.
- 239.- MORENO,M.A. (1984) Micoflora y micotoxinas en piensos compuestos comerciales para aves. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense. Madrid.
- 240.- MOSS,M.O. (1975) Role of mycotoxins in disease of man. Int.J.Environ.Studies , 8: 165.
- 241.- MOSS,M.O. (1984) Conditions and factors influencing mycotoxin formation in the field and during the storage of food. Chem.Industry , 15: 533-536.
- 242.- MOUBASHER,A.H., M.I.A.ABDEL-KADER y I.A.EL-KADY (1978) Toxigenic fungi isolated from Roquefort cheese. Mycopathologia , 66: 187-190.
- 243.- MUJICA,M.T. y B.J.CORALLINI (1985) Eliminación de aflatoxina B<sub>1</sub> "in vitro" por crecimiento de hongos competitivos. Rev.Lat-americ.Microbiol. , 27: 169-174.

- 244.- NEUMANN-KLEINFAUL, A. y G. TERPLAN (1973) Zum Vorkommen von Aflatoxin M<sub>1</sub> in Trockenmilchprodukten. Arch. Lebensm., 23: 128-132.
- 245.- NILES, E. V., J. A. NORMAN y D. PIMBLEY (1985) Growth and aflatoxin production of Aspergillus flavus in wheat and barley. Trans. Br. Mycol. Soc., 84: 259-266.
- 246.- NISHIJIMA, M. (1984) Survey for mycotoxins in commercial foods. En "Toxigenic fungi-their toxins and health hazard". Ed. H. Kurata. ELSEVIER. AMSTERDAM.
- 247.- NORTHOLT, M. D. (1983) Pathogenic micro-organisms in fermented dairy products. Neth. Milk Dairy J. 37: 247-248.
- 248.- NORTHOLT, M. D., H. F. VAN EGMOND y W. E. PAULSCH (1977) Differences between Aspergillus flavus strains in growth and aflatoxin B<sub>1</sub> production in relation to water activity and temperature. J. Food Prot., 40: 778-781.
- 249.- NORTHOLT, M. D., H. F. VAN EGMOND, P. SOENTORO y E. DEIJLL (1980) Fungal growth and the presence of sterigmatocystin in hard cheese. J. Assoc. Offic. Anal. Chem., 63: 115.
- 250.- OLDHAM, L. S., F. W. DEHME y D. C. KELLEY (1971) Production of aflatoxin in pre-packaged luncheon meat and cheese

at refrigerator temperatures. J.Milk\_Food\_Technol. ,  
34: 349-351.

251.- PAI,M.R., N.J.BAI y T.A.VENKITASUBRAMANIAN (1975)  
Production of aflatoxin M<sub>1</sub> in a liquid medium.  
Appl.Microbiol. , 29: 850-851.

252.- PALACIOS,J. y A.AVENOZA (1984) Aflatoxinas y vino. IV  
Reunión Científica Grupo de Microbiología de los  
Alimentos de la SEM. Pamplona.

253.- PALOMES,A., V.SANCHIS, N.SALA y P.A.BURDASPAL (1984)  
Prospección a nivel colaborativo sobre la contaminación  
de micotoxinas y hongos en alimentos susceptibles. IV  
Reunión Científica Grupo de Microbiología de los  
Alimentos de la SEM. Pamplona.

254.- PAPADAKES,N., G.A.STATHOPOULOS y P.TSOUMFARES (1983)  
(Detection and determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk  
products). Hemika\_Hronika , 48: 45-47.

255.- PARK,K.Y. y L.B.BULLERMAN (1983) Effects of substrate  
and temperature on aflatoxin production by Aspergillus  
parasiticus and Aspergillus\_flavus . J.Food\_Prot. ,  
46: 178-187.

256.- PARK,K.Y. y L.B.BULLERMAN (1983) Effect of cycling  
temperatures on aflatoxin production by Aspergillus

parasiticus and Aspergillus flavus in rice and Cheddar cheese. J.Food.Sci. , 48: 889-896.

- 257.- PARVANEH,V., M.SHAHIN, G.KARIM y J.KORDI (1982)  
Investigation of aflatoxin contamination of Iranian white cheese. XXI International Dairy Congress. Vol 1, Book 2. Moscu.
- 258.- FATEL,P.M., S.P.NETKE, B.S.GUPTA y A.K.DABADGHAD (1981)  
Note on the effect of procesing milk into khoa on aflatoxin M<sub>1</sub> content. Indian\_J.Anim.Sci. , 51: 791-792.
- 259.- FATEL,P.M., S.P.NETKE, B.S.GUPTA y A.K.DABADGHAD (1981)  
Note on the survey of consumer milk supplied to Jabalpur city for the incidence of aflatoxin M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub>. Indian\_J.Anim.Sci. , 51: 906.
- 260.- PATTERSON,D.S.F., E.M.GLANCY y B.A.ROBERTS (1978) The estimation of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk using a two-dimensional thin layer chromatographic method suitable for survey work. Food\_Cosmet.Toxicol. , 16: 49-50.
- 261.- PATTERSON,D.S.F., E.M.GLANCY y B.A.ROBERTS (1980) The "carry over" of aflatoxin M<sub>1</sub> into the milk of cows fed rations containing a low concentration of aflatoxin B<sub>1</sub>. Food\_Cosmet.Toxicol. , 18: 35-37.

- 262.- PATTERSON,D.S.P. y B.A.ROBERTS (1975) An improved semi-quantitative method for the estimation of aflatoxin M<sub>1</sub> in liquid milk. Food Cosmet. Toxicol. , 13: 541-542.
- 263.- PAUL,P. y V.THURM (1983) Bestimmung und Vorkommen von Aflatoxin M<sub>1</sub> in Milch und Trocken milchprodukten. Die Nahrung , 27: 877-882.
- 264.- PAUL,R., M.S.KALRA y A.SINGH (1976) Incidence of aflatoxins in milk and milk products. Indian J.Dairy Sci. , 29: 318-321.
- 265.- PEERS,F.G. y C.A.LINSELL (1977) Dietary aflatoxins and human primary liver cancer. Ann.Nutr.Alim. , 31: 1005-1018.
- 266.- PESTKA,J.J. y F.S.CHU (1984) Enzyme-linked immunosorbent assay of mycotoxins using nylon bead and terasaki plate solid phases. J.Food Prot. , 47: 305-308.
- 267.- PESTKA,J.J., Y.LI, W.O.HARDER y F.S.CHU (1981) Comparison of radioimmunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay for determining aflatoxin M<sub>1</sub> in milk. J.Assoc.Offic.Anal.Chem. , 64: 294-301.

- 268.- PFLEGER, R. y E. BRANDL (1980) Aflatoxinrückstände in Trockenmilch Österreichischer Herkunft. Wiener Tier. Monat. , 67: 101-106.
- 269.- PITT, J. I., A. D. HOCKING y D. R. GLENN (1983) An improved medium for the detection of Aspergillus flavus and A. parasiticus . J. Appl. Bacteriol. , 54: 109-114.
- 270.- FIVA, G., A. PIETRI y E. CARINI (1985) Presenza di aflatosina M<sub>1</sub> in prodotti lattiero-caseari. I. Latti e formaggi prodotti in Italia. Riv. Soc. Ital. Sci. Alim. , 14: 59-62.
- 271.- PLATT, B. S., R. J. C. STEWART y S. R. GUPTA (1962) The chick embryo as a test organism for toxic substances in food. Proc. Nutr. Soc. , 21: 30-31.
- 272.- POLAN, C. E., J. R. HAYES y T. C. CAMPBELL (1974) Consumption and fate of AFB<sub>1</sub> by lactating cows. J. Agric. Food Chem. , 22: 635-638.
- 273.- POLZHOFFER, K. F. (1977) Aflatoxinbestimmung in Milch und Milchprodukten. Z. Lebensm. Unters. Forsch. , 163: 175-177.
- 274.- POLZHOFFER, K. F. (1977) Hitzestabilität von Aflatoxin M<sub>1</sub>. Z. Lebensm. Unters. Forsch. , 164: 80-81.

- 275.- POLZHOFFER, K.F. (1977) Modellversuche zur Aflatoxinbildung in Schmelzkäse. Z. Lebensm. Unters. Forsch., 164: 94-95.
- 276.- POMPA, G., R. FIORDELISI, G. OSTINELLI y A. ZECCONI (1984) Indagini sulla presenza di micotossine (aflatossina M<sub>1</sub>) e residui composti organoclorurati nel latte d'importazione. Archiv. Vet. Ital., 35: 74-81.
- 277.- PONS, W.A. Jr., A.F. CUCULLU y L.S. LEE (1973) Method for determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in fluid milk and milk products. J. Assoc. Offic. Anal. Chem., 56: 1431-1436.
- 278.- PRICE, R.L., J.H. PAULSON, O.G. LOUGH, C. GINGG y A.G. KURTZ (1985) Aflatoxin conversion by dairy cattle consuming naturally contaminated whole cottonseed. J. Food Prot., 48: 11-15.
- 279.- PRZYBYLSKI, K.S. y L.B. BULLERMAN (1980) Influence of sorbic acid on viability and ATP content of conidia of Aspergillus parasiticus. J. Food Sci., 45: 375-376, 385.
- 280.- PRZYBYLSKI, W. (1975) Formation of aflatoxin derivatives on thin layer chromatographic. J. Assoc. Offic. Anal. Chem., 58: 163-164.
- 281.- PURCHASE, I.F.H. (1973) The control of aflatoxin

residues in food of animal origin. Pure Appl.Chem. ,  
35: 283-289.

282.- PURCHASE,I.F.H., M.STEYN y H.E.PRETORIUS (1968) The  
production of aflatoxin M<sub>1</sub> on various substrates.  
Mycopathol.Mycol.Appl. , 35: 239-244.

283.- PURCHASE,I.F.H., M.STEYN, R.RINSMA y R.C.TUSTIN (1972)  
Reduction of the aflatoxin M<sub>1</sub> content of milk by  
processing. Food Cosmet.Toxicol. , 10: 383-387.

284.- PURCHASE,I.F.H. y L.J.VORSTER (1968) Aflatoxin in  
commercial milk samples. S.Afr.Med.J. , 42: 219.

285.- QUINTANILLA,J.A. (1980) Hongos de los Géneros  
Aspergillus Micheli y Penicillium Link presentes en  
maíz nacional destinado a fabricación de piensos  
compuestos: clasificación y toxicogenia de las cepas  
aisladas. Hygia.Pecoris , 2: 75-92.

286.- QUINTANILLA,J.A. (1980) Hongos micotoxicogénicos en  
cebada de la región castellana. A.Y.M.A. , 21:  
473-484.

287.- QUINTAVALLA,S. y A.CASOLARI (1985) Indagine sulla  
presenza di aflatossina M<sub>1</sub> nel latte e derivati.  
Industria Conserve , 60: 85-91.



- 288.- RAMAUT,J.L., C.VANDERHOVEN y J.REMACLE (1970) Etude de la production d'aflatoxine B<sub>1</sub> en fonction des étapes du développement morphologique d' Aspergillus flavus Link. Rev.Ferment.Ind.Alim. , 25: 184-188.
- 289.- RANFFT,K. (1983) Aflatoxin M<sub>1</sub> in Milchpulver. Ein schnelles Bestimmungsv erfahren und eine Bestandsaufnahme zum Vorkommen. Milchwissenschaft , 38: 328-329.
- 290.- READ,R.B. y J.BRADSHAW (1966) Staphylococcal enterotoxin B thermal inactivation in milk. J.Dairy Sci. , 49: 202-203.
- 291.- REDDY,T.V., L.VISWANATHAN y T.A.VENKITASUBRAMANIAN (1971) High aflatoxin production on a chemically defined medium. Appl.Microbiol. , 22: 393-396.
- 292.- REHM,H.J. y I.SCHMIDT (1969) Aflatoxinbildung in Butter und Margarine. Z.Lebensm.Unters.Forsch. , 140: 164-165.
- 293.- REISS,J. (1975) Mycotoxins in foodstuffs. V.The influence of temperature, acidity and light on the formation of aflatoxins and patulin in bread. Eur.J.Appl.Microbiol. , 2: 183-190.
- 294.- REISS,J. (1978) Mycotoxins in foodstuffs. XII.The

influence of the water activity (aw) of cakes on the growth of moulds and the formation of mycotoxins.

Z.Lebensm.Unters.Forsch. , 167: 419-422.

295.- REISS, J. (1981) Mycotoxins in foodstuffs. XIII. Studies on the formation of aflatoxin M<sub>1</sub> in bakery products.

Z.Lebensm.Unters.Forsch. , 172: 26-29.

296.- RIBERZANI, A., S. CASTELLI, A. DEL VO y C. PEDRETTI (1983)

Aflatossina M<sub>1</sub> in alcuni alimenti a base di latte.

Industria Alimentari , 22: 342-346.

297.- ROBERTS, B.A. y R. ALLCROFT (1968) A note on the quantitative estimation of aflatoxin M<sub>1</sub> in liquid milk

by thin layer chromatography. Food Cosmet. Toxicol. , 6: 339-340.

298.- RODRICKS, J.V. (1969) Note on adsorption of aflatoxin standards to glass. J. Assoc. Offic. Anal. Chem. , 52:

979-980.

299.- ROTHENBUHLER, E. y M. BACHMANN (1970) (Formation of aflatoxin in cheese). Schweiz. Milchzeitg. , 96:

1053-1056.

300.- SABINO, M. (1984) Aflatoxinas no leite.

Rev. Inst. Lat. Candido Iostes , 39: 47-48.

- 301.- SABINO,M., A.PURCHIO y M.A.P.ZORZETTO (1985) Variation in the levels of aflatoxin in cow milk consumed in the city of Sao Paulo, Brazil. Abstracts 6th International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. IUPAC.
- 302.- SAITO,K., M.NISHIJIMA, H.KAMIMURA, A.IBE, S.OCHIAI y Y.NAOI (1979) (Analytical method and investigation of natural occurrence of aflatoxins in dairy products). J.Food Hyg.Soc.Jap. , 20: 27-32.
- 303.- SAITO,K., M.NISHIJIMA, K.YASUDA, H.KAMIMURA, A.IBE, T.NAGAYAMA, H.USHIYAMA y Y.NAOI (1980) (Natural occurrence of aflatoxins in commercial cheese). J.Food Hyg.Soc.Jap. , 21: 472-475.
- 304.- SALA,N, A.FALOMES, P.SANTAMARINA y V.SANCHIS (1984) Cereales en Cataluña. Estudio de la micoflora y la presencia de micotoxinas. IV Reunión Científica Grupo Microbiología de los Alimentos de la SEM. Pamplona.
- 305.- SALUNKHE,D.K., M.T.WU, J.Y.DO y M.R.MAAS (1979) Mycotoxins in foods and feeds. En "Safety of foods". Ed.H.D.Graham. AVI PUBLISHING COMPANY, INC. WESTPORT. CONNECTICUT.
- 306.- SANCHIS,V., A.SAMO, J.HERNANDEZ y E.HERNANDEZ (1980) Contenido de aflatoxinas y Aspergillus flavus en maíz almacenado en silos comerciales.

Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment. , 20: 371-380.

307.- SANCHIS,V., I.VIÑAS, M.JIMENEZ, M.A.CALVO y E.HERNANDEZ  
(1982) Mycotoxin producing fungi isolated from  
bin-stored corn. Mycopathologia , 80: 89-93.

308.- SANCHIS,V., I.VIÑAS, M.JIMENEZ y E.HERNANDEZ (1981)  
Presencia de Aspergillus flavus y aflatoxina en maíz  
de campo. Actas VIII Congreso Nacional de  
Microbiología. Madrid.

309.- SANCHIS,V., I.VIÑAS, M.JIMENEZ y E.HERNANDEZ (1983)  
Detección rápida de cepas de Aspergillus flavus  
productoras de aflatoxinas.  
Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment. , 23: 54-59.

310.- SANCHIS,V., I.VIÑAS, M.JIMENEZ y E.HERNANDEZ (1984)  
Aflatoxina y A. flavus en maíz de campo y almacenado  
en silos. Factores que influyen en su presencia.  
Rev. Iber. Micol. , 1: 71-78.

311.- SANDERS,T.H. (1968) Effect of carbon dioxide,  
temperature and relative humidity on production of  
aflatoxin in peanuts. J. Amer. Oil Chem. Soc. , 45:  
663-685.

312.- SANTAMARINA,F., M.JIMENEZ, N.SALA y J.VIÑAS (1984)  
Aproximación al estudio de la micoflora del arroz. IV

Reunión Científica Grupo Microbiología de los Alimentos  
de la SEM. Pamplona.

- 313.- SANTAMARINA,P., V.SANCHIS y E.HERNANDEZ (1982)  
Detección de aflatoxinas en cacahuetes comerciales. III  
Reunión Científica Grupo Microbiología de los Alimentos  
de la SEM.
- 314.- SANZ,B., J.PALACIOS, J.TORMO y P.LOPEZ (1973)  
Investigación de aflatoxinas en diversos alimentos  
españoles. Anal.Bromatol. , 25: 297-320.
- 315.- SCOTT,F.M. (1978) Mycotoxins in feeds and ingredients  
and their origin. J.Food Prot. , 41: 385-398.
- 316.- SCOTT,F.M., W.VAN WALBEEK y J.FORGACS (1967) Formation  
of aflatoxins by Aspergillus\_ostianus Wehmer.  
Appl.Microbiol. , 15: 945.
- 317.- SCHADE,J.E. y A.D.KING (1984) Fluorescence and  
aflatoxin content of individual almond kernels  
naturally contaminated with aflatoxin. J.Food\_Sci. ,  
49: 493-497.
- 318.- SCHINDLER,A.F. (1977) Temperature limits for production  
of aflatoxin by 25 isolates of Aspergillus\_flavus and  
Aspergillus\_parasiticus J.Food Prot. , 40: 39-40.

- 319.- SCHINDLER,A.F., J.G.FALMER y W.V.EISENBERG (1967)  
Aflatoxin production by Aspergillus flavus as related  
to various temperatures. Appl.Microbiol. , 15:  
1006-1009.
- 320.- SCHROEDER,H.W. y H.HEIN,Jr. (1967) Aflatoxins:  
Production of the toxins in vitro in relation to  
temperature. Appl.Microbiol. , 15: 441-445.
- 321.- SCHROEDER,H.W. y H.HEIN,Jr. (1968) Effect of diurnal  
temperature cycles on the production of aflatoxin.  
Appl.Microbiol. , 16: 988-990.
- 322.- SCHROEDER,H.W. y J.VERRETT (1967) Production of  
aflatoxin by Aspergillus wentii Wehmer.  
Can.J.Microbiol. , 15: 945.
- 323.- SCHUDDEBROOM,L.J. (1983) Development of legislation  
concerning mycotoxins in dairy products in the  
Netherlands. Microb.Alim.Nutr. , 1: 179-185.
- 324.- SCHULLER,F.L., C.A.H.VERHULSDONK y W.E.PAULSCH (1973)  
Analysis of aflatoxin M<sub>1</sub> in liquid and powdered milk.  
Pure.Appl.Chem. , 35: 291-296.
- 325.- SERCK-HANSEN,A. (1970) Aflatoxin induced fatal  
hepatitis. Arch.Environ.Health , 20: 729.

- 326.- SHANK, R.C., G.N.WOOGAN y J.B.GIBSON (1972) Dietary aflatoxins and human liver cancer. I. Toxigenic moulds in foods and foodstuffs of tropical Southeast Asia. Food Cosmet. Toxicol. , 10: 51.
- 327.- SHARMA, A., A.G.BEHERE, S.R.PADWAL-DESAI y G.B.NADKARNI (1980) Influence of inoculum size of Aspergillus parasiticus spores on aflatoxin production. Appl. Environ. Microbiol. , 40: 989-993.
- 328.- SHARMANDV, T.S., F.S.NIKOV, L.M.FADEEVA y A.S.BUKHARBAEVA (1984) (Current problems of mycotoxins). Voprosy Pitaniya , 1: 7-12.
- 329.- SHIH, C.N. y E.H.MARTH (1971) A procedure for rapid recovery of aflatoxins from cheese and other foods. J. Milk Food Technol. , 34: 119-123.
- 330.- SHIH, C.N. y E.H.MARTH (1972) Experimental production of aflatoxin on Brick cheese. J. Milk Food technol. , 35: 585-587.
- 331.- SHIH, C.N. y E.H.MARTH (1972) Production of aflatoxin in a medium fortified with sodium chloride. J. Dairy Sci. , 55: 1415-1419.
- 332.- SHIH, C.N. y E.H.MARTH (1973) Aflatoxin produced by Aspergillus parasiticus when incubated in the presence

of different gases. J.Milk\_Food\_Technol. , 36:  
421-425.

333.- SHIH,C.N. y E.H.MARTH (1973) Release of aflatoxin from  
the mycelium of Aspergillus parasiticus into liquid  
media. Z.Lebensm.Unters.Forsch. , 152: 336-339.

334.- SHIH,C.N. y E.H.MARTH (1974) Aflatoxin formation, lipid  
synthesis and glucose metabolism by Aspergillus  
parasiticus during incubation with and without  
agitation. Bioch.Bioch.Acta , 338: 286-296.

335.- SHIH,C.N. y E.H.MARTH (1974) Some cultural conditions  
that control biosynthesis of lipid and aflatoxin by  
Aspergillus\_\_parasiticus . Appl.Microbiol. , 27:  
452-456.

336.- SHIH,C.N. y E.H.MARTH (1975) Production of aflatoxin  
and its partition between the medium and the mycelium  
of Aspergillus\_\_parasiticus during incubation under  
various conditions. Z.Lebensm.Unters.Forsch. , 158:  
215-224.

337.- SHOTWELL,D.L., M.L.GOULDEN y C.W.HESSELTINE (1972)  
Aflatoxin contamination: association with foreign  
material and characteristic fluorescence in damaged  
corn kernels. Cereal\_Chem. , 49: 458.



- 338.- SIEBER,R. (1978) Zur frage der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von in der Kasefabrikation verwendeten Schimmelpilzkulturen. Z.Ernahrungswiss , 17: 112-123.
- 339.- SIEBER,R. y B.BLANC (1978) Zur Ausscheidung von Aflatoxin M<sub>1</sub> in die Milch und dessen Vorkommen in Milch und Milchprodukten. Eine Literaturübersicht. Mittel.Gebiete.Lebens.Hyg. , 69: 477-491.
- 340.- SKRINJAR,M., R.ZAKULA y E.STOJANOVIC (1983) (Isolation and determination of moulds in raw milk). Mliekarstvo, 33: 227-230.
- 341.- SORENSON,W.G., W.JONES, J.SIMPSON y J.I.DAVIDSON (1984) Aflatoxin in respirable airborne peanut dust. J.Toxicol.Environ.Health , 14: 525-533.
- 342.- SORENSON,W.G., C.W.HESSELTINE y O.L.SHOTWELL (1967) Effect of temperature on production of aflatoxin on rice by Aspergillus flavus . Mycopathol.Mycol.Appl. , 33: 49-55.
- 343.- SPILLMAN,H. y O.GEIGES (1983) Identifikation von Hefen und Schimmelpilzen aus bombierten Joghurt-Packungen. Milchwissenschaft , 38: 129-132.
- 344.- STACK,M.E. y A.E.FOHLAND (1975) Collaborative study of a method for chemical confirmation of the identity of

aflatoxin. J.Assoc.Offic.Anal.Chem. , 58: 110-113.

345.- STOLOFF,L. (1980) Aflatoxin control: past and present.  
J.Assoc.Offic.Anal.Chem. , 63: 1067-1073.

346.- STOLOFF,L. (1980) Aflatoxin M in perspective. J.Food  
Prot. , 43: 226-230.

347.- STOLOFF,L. (1983) The hazard to man from aflatoxin  
ingestion. Food Research Institute. Annual Spring  
Meeting.

348.- STOLOFF,L. (1983) Aflatoxin as a cause of primary  
liver-cell cancer in the United States: a probability  
study. Nutr.Cancer , 5: 165-186.

349.- STOLOFF,L. y W.TRAGER (1965) Recommended  
decontamination procedures for aflatoxin.  
J.Assoc.Offic.Agric.Chem. , 48: 681-682.

350.- STOLOFF,L., M.TRUCKSESS, N.HARDIN, D.J.FRANCIS.  
J.R.HAYES, C.E.POLAN y T.C.CAMPBELL (1975) Stability of  
aflatoxin M in milk. J.Dairy\_Sci. , 58: 1789-1793.

351.- STOLOFF,L., G.WOOD y L.CARTER,Jr. (1981) Aflatoxin M<sub>1</sub>  
in manufactured dairy products produced in the United  
States in 1979. J.Dairy\_Sci. , 64: 2426-2430.

- 352.- STORA,C., I.DVORACKOVA y N.AYRAUD (1983) Aflatoxin and  
Reye's syndrome. J.Med. , 14: 47-54.
- 353.- STUBBLEFIELD,R.D. (1979) The rapid determination of  
aflatoxin M<sub>1</sub> in dairy products. J.Amer.Oil.Chem.Soc. ,  
56: 800-802.
- 354.- STUBBLEFIELD,R.D., A.C.PIER, J.L.RICHARD y D.L.SHOTWELL  
(1983) Fate of aflatoxins in tissues, fluids and  
excrements from cows dosed orally with aflatoxin B<sub>1</sub>.  
Am.J.Vet.Res. , 44: 1750-1752.
- 355.- STUBBLEFIELD,R.D. y G.M.SHANNON (1974) Aflatoxin M<sub>1</sub>:  
analysis in dairy products and distribution in dairy  
foods made from artificially contaminated milk.  
J.Assoc.Offic.Anal.Chem. , 57: 847-851.
- 356.- STUBBLEFIELD,R.D., G.M.SHANNON y D.L.SHOTWELL (1973)  
Aflatoxin M<sub>1</sub> in milk. Evaluation of methods.  
J.Assoc.Offic.Anal.Chem. , 56: 1106-1110.
- 357.- STUBBLEFIELD,R.D., H.F.VAN EGMOND, W.E.PAULSCH y  
P.L.SCHULLER (1980) Determination and confirmation of  
identity of aflatoxin M<sub>1</sub> in dairy products:  
collaborative study. J.Assoc.Offic.Anal.Chem. , 63:  
907-921.
- 358.- STUTZ,H.K. y P.H.KRUMPERMAN (1976) Effect of

temperature cycling on the production of aflatoxin by Aspergillus parasiticus . Appl. Environ. Microbiol. , 32: 327-332.

359.- SUTIC, M., V. DEVIC, D. OBRADOVIC y A. BANINA (1983) (Sensitivity of strains of Lactobacillus casei and L. lactis to aflatoxin B<sub>1</sub>. Mliekarstvo , 33: 259-267.

360.- SUTIC, M., S. MITIC y N. SVILAR (1979) (Aflatoxins in milk and milk products). Mliekarstvo , 29: 74-80.

361.- SUZANGAR, M., A. EMAMI y R. BARNETT (1976) Aflatoxin contamination of village milk in Isfahan, Iran. Trop. Sci. , 18: 155-159.

362.- TANTADUI-ELARAKI, A. y M. J. JACQUET (1978) Influence de la densité de contamination en spores d' Aspergillus flavus sur la production d'aflatoxine B<sub>1</sub> dans les aliments. Compt. Rend. Seanc. Acad. Agr. Fr. , 64: 69-77.

363.- TANTADUI-ELARAKI, A. y N. KHABBAZI (1984) Contamination eventuelle des fromages par les mycotoxines: une revue. Lait , 63: 46-71.

364.- TEUBER, M. y G. ENGEL (1983) Low risk of mycotoxin production in cheese. Microb. Alim. Nutr. , 1: 193-197.

365.- TORREY, G. S. y E. H. MARTH (1977) Isolation and toxicity

- of molds from foods stored in homes. J. Food Prot. , 40: 187.
- 366.- TRENK, H.L. y P.A. HARTMAN (1970) Effects of moisture content and temperature on aflatoxin production in corn. Appl. Microbiol. , 19: 781-784.
- 367.- TRIPET, F.Y., C. RIVA y J. VOGEL (1981) Contamination du lait et des produits laitiers par l'aflatoxine M<sub>1</sub>. Lait , 61: 634-637.
- 368.- TRIPET, F.Y., C. RIVA y J. VOGEL (1981) Recherche des aflatoxines et dosage de l'aflatoxine M<sub>1</sub> dans les produits laitiers. Trav. Chim. Aliment. Hyg. , 72: 367-379.
- 369.- TSAI, W.J., K.F. SHAO y L.B. BULLERMAN (1984) Effects of sorbate and propionate on growth and aflatoxin production of sublethally injured Aspergillus parasiticus . J. Food Sci. , 49: 86-90, 93.
- 370.- TSUBOI, S., T. NAKAGAWA, M. TOMITA, T. SEO, H. ONO, K. KAWAMURA y N. IWAMURA (1984) Detection of aflatoxin B<sub>1</sub> in serum samples of male Japanese subjects by radioimmunoassay and high performance liquid chromatography. Cancer Res. , 44: 1231-1234.
- 371.- TSUBOUCHI, H., K. YAMAMOTO, K. HISADA, Y. SAKABE y

- K.TSUCHICHIRA (1981) (Inhibitory effects of nonaflatoxigenic fungi on aflatoxin production in rice cultures by Aspergillus flavus ). Trans.Mycol.Soc.Jap. , 22: 103-111.
- 372.- TUINSTRA,L.G.M. y J.M.BRONSGEEST (1975) Determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk at the parts per trillion level. J.Chromatography , 111: 448-451.
- 373.- VADILLO,S. (1984) Contaminación bacteriana y fúngica en la leche natural y pasteurizada de la zona Centro. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense. Madrid.
- 374.- VADILLO,S., M.J.PAYA, A.MATEOS, M.T.CUTULI, E.F.RODRIGUEZ y G.SUAREZ (1982) Estudio de la micoflora de la leche natural. Consecuencias de la pasteurización baja. III Reunión Científica Grupo Microbiología de los Alimentos de la SEM. León.
- 375.- VADILLO,S., E.F.RODRIGUEZ, L.DOMINGUEZ y G.SUAREZ (1985) Estudio de la calidad bacteriológica de la leche procedente de la zona Centro de España. Alimentaria , 165: 13-24.
- 376.- VAN DER LINDE,J.A., A.M.VAN DER FRENS y G.J.VAN ESCH (1965) Experiments with cows fed groundnut meal containing aflatoxin. En "Mycotoxin in foodstuffs".

Ed.G.N.Wogan. MIT PRESS. CAMBRIDGE.

- 377.- VAN EGMOND, H.F. (1983) Mycotoxins in dairy products. Food Chem. , 11: 289-307.
- 378.- VAN EGMOND, H.F., W.E. PAULSCH y P.L. SHULLER (1978) Confirmatory test for aflatoxin M<sub>1</sub> on a thin layer plate. J. Assoc. Offic. Anal. Chem. , 61: 809-812.
- 379.- VAN EGMOND, H.F., W.E. PAULSCH, H.A. VERINGA y P.L. SHULLER (1977) The effect of processing on the aflatoxin M<sub>1</sub> content of milk and milk products. Archiv. Inst. Pasteur Tunis , 3-4: 381-390.
- 380.- VAN FEE, W., J. VAN BRABANT y J. JOOSTENS (1977) La detection et le dosage de l'AFM<sub>1</sub> dans le lait et le lait en poudre. Rev. Agric. , 30: 403.
- 381.- VAN WALBEEK, W., T. CLADEMENOS y F.S. THATCHER (1969) Influence of refrigeration on aflatoxin production by strains of Aspergillus flavus . Can. J. Microbiol. , 15: 629-632.
- 382.- VAN WALBEEK, W., P.M. SCOTT y F.S. THATCHER (1968) Mycotoxins from food-borne fungi. Can. J. Microbiol. , 14: 131-137.
- 383.- VANDERHOVEN, C., J. REMACLE y J.L. RAMAUT (1970) Recherche

d'un rapport eventuel entre la morphologie de diverses souches d' Aspergillus flavus Link et leur production d'aflatoxines. Rev.Ferment.Ind.Alim. , 25: 184-188.

- 384.- VERDYAN,N.M. (1981) (Toxicogeneity of Aspergillus flavus isolated from cheese). Biolog.Zhur.Arm. , 36: 989.
- 385.- VESELA,D., D.VESELÝ y V.KUSAK (1982) (Presence of aflatoxin M<sub>1</sub> in market milk). Ceskos.Myg. , 27: 282-284.
- 386.- VIROBEN,G., J.M.FREMY y J.DELORT-LAVAL (1983) Traitement à froid des tourteaux d'arachide par une solution aqueuse d'ammoniaque: consequence sur la reduction de la teneur du lait en aflatoxine M<sub>1</sub>. Lait, 63: 171-179.
- 387.- VISCONTI,A., A.BOTTALICO y M.SOLFRIZZO (1985) Aflatoxin M<sub>1</sub> in milk in Southern Italy. Mycotoxin Research , 1: 71-75.
- 388.- WALKING,A. (1971) Fate of aflatoxin during roasting and storage of contaminated peanut products. J.Assoc.Offic.Anal.Chem. , 54: 533.
- 389.- WATSON,D.H. (1984) Survey and control of mycotoxins in animal and human foods. Chem.Industry , 15: 536-540.



- 390.- WECKBACH,L.S. y E.H.MARTH (1977) Aflatoxin production by Aspergillus parasiticus in a competitive environment. Mycopathologia , 62: 39-45.
- 391.- WEISS,G., M.MILLER y G.BEHRINGER (1978) Vorkommen und Gehalt an Aflatoxin M<sub>1</sub> in Molkereiprodukten. Störungslichkeiten beim Nachweis von Aflatoxin M<sub>1</sub>. Milchwissenschaft , 33: 409-412.
- 392.- WESSEL,J.R. y L.STOLDOFF (1973) Regulatory surveillance for aflatoxin and other mycotoxins in feeds, meat and milk. J.A.V.M.A. , 163: 1284-1287.
- 393.- WICKLOW,D.T. y D.L.SHOTWELL (1983) Intrafungal distribution of aflatoxins among conidia and sclerotia of Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus . Can.J.Microbiol. , 29: 1-5.
- 394.- WILDMAN,J.D., L.STOLDOFF y R.JACOBS (1967) Aflatoxin production by a potent Aspergillus flavus Link isolate. Biotech.Bioeng. , 9: 429-437.
- 395.- WILSON,B.J. (1978) Hazards of mycotoxins to public health. J.Food Prot. , 41: 375-384.
- 396.- WINTERLIN,W., G.HALL y D.P.H.HSIEH (1979) On column chromatographic extraction of aflatoxin M<sub>1</sub> from milk

and determination by reversed phase high performance liquid chromatography. Anal.Chem. , 51: 1973-1974.

- 397.- WISEMAN,D.W., R.S.APPLEBAUM, R.E.BRACKETT y E.H.MARTH (1983) Distribution and resistance to pasteurization of aflatoxin M<sub>1</sub> in naturally contaminated whole milk, cream and skim milk. J.Food.Prot. , 46: 530-532.
- 398.- WISEMAN,D.W. y E.H.MARTH (1981) Growth and aflatoxin production by Aspergillus parasiticus when in the presence of Streptococcus lactis . Mycopathologia , 73: 49-56.
- 399.- WISEMAN,D.W. y E.H.MARTH (1983) Behavior of aflatoxin M<sub>1</sub> in yogurt, buttermilk and kefir. J.Food.Prot. , 46: 115-118.
- 400.- WISEMAN,D.W. y E.H.MARTH (1983) Stability of aflatoxin M<sub>1</sub> during manufacture and storage of a butter-like spread, non-fat dried milk and dried buttermilk. J.Food.Prot. , 46: 633-636.
- 401.- WISEMAN,D.W. y E.H.MARTH (1983) Behavior of aflatoxin M<sub>1</sub> during manufacture and storage of queso Blanco and Bakers' cheese. J.Food.Prot. , 46: 910-913.
- 402.- WISEMAN,D.W. y E.H.MARTH (1983) Stability of aflatoxin M<sub>1</sub> during manufacture and storage of ice-cream and

sherbet. Z. Lebensm. Unters. Forsch. , 177: 22-24.

- 403.- WISEMAN, D.W. y E.H. MARTH (1983) Heat and acidstability of aflatoxin M<sub>1</sub> in naturally and artificially contaminated milk. Milchwissenschaft , 38: 464-466.
- 404.- YNDESTAD, M. y B. UNDERDAL (1975) (Aflatoxin in foods on the Norwegian market). Nord. Vet. Med. , 27: 42-48.
- 405.- YOUSEF, A.E. y E.H. MARTH (1981) Growth and synthesis of aflatoxin by Aspergillus parasiticus in the presence of sorbic acid. J. Food Prot. , 44: 736-741.
- 406.- YOUSEF, A.E. y E.H. MARTH (1984) Elimination of aflatoxin M<sub>1</sub> from milk. Food Research Institute. Annual Report.
- 407.- ZAFFAVIGNA, R. y G. CERUTTI (1973) Le aflatossine nel latte e derivati: attuali conoscenze e primi risultati sperimentali. Latte , 47: 399-404.
- 408.- ZERFIRIDIS, G.K. (1985) Production of aflatoxins on inoculated Teleme cheese. J. Food Prot. , 48: 961-964.
- 409.- ZERFIRIDIS, G.K. (1985) Potential aflatoxin hazards to human health from direct mold growth on Teleme cheese. J. Dairy Sci. , 68: 2184-2188.
- 410.- ZIMMERLI, B. y O. BLASER (1979) Vorkommen von Aflatoxin M<sub>1</sub>

- 507 -

in Milch. Mitt.Gebiete.Lebens.Hyg. , 70: 287-293.



BIBLIOTECA